

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
UMR 6265 CNRS - 1324 INRA – Université de Bourgogne

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

par

Alexandra COELHO

25 Septembre 2014

**Rôle des Cytochromes P450 dans la perception sensorielle et le
métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster***

JURY

Serge BIRMAN	Rapporteur	DR, CNRS- ParisTech
Martine MAIBECHE-COISNE	Rapporteuse	Pr, Université Paris VI
Nicolas CABATON	Examineur	CR, INRA-Toulouse
Marie-Laure PARMENTIER	Examinatrice	DR, INSERM-Montpellier
Yves ARTUR	Président du Jury	Pr, Université de Bourgogne
Stéphane FRAICHARD	Co-Directeur	IR, Université de Bourgogne
Jean-Marie HEYDEL	Directeur	Pr, Université de Bourgogne

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury, Martine Maibèche-Coisne, Marie-Laure Parmentier, Serge Birman, Nicolas Cabaton et Yves Artur pour avoir accepté d'évaluer mon travail et d'assister à ma soutenance.

Je voudrais également remercier Jean-François-Ferveur et Loïc Brillant pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et de m'avoir permis de mener à bien mon projet de thèse. Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse Stéphane Fraichard et Jean-Marie Heydel. Merci d'avoir eu confiance en moi, de m'avoir soutenue et remotivée dans les moments les plus délicats. J'ai fait le bon choix et j'espère que de nombreux étudiants auront la chance de travailler avec vous deux.

Quelques mots particuliers: Stéphane tu vas pouvoir récupérer ton bureau et garder Maurice et Adélaïde. Finies les affaires qui trainent, les petits gâteaux, bonbons et chocolats en tout genre pour passer l'hiver...

Grâce à toi, j'ai énormément appris. Cette expérience m'a profondément changé et à ma grande surprise, je commence à parler le geek. On est mal barré. J'ai réussi à développer mon instinct de survie. Toujours rester positive face aux catastrophes administratives et expérimentales est devenu ma devise. J'ai également acquis un sens de l'orientation qui nous a sûrement sauvé la vie plusieurs fois en congrès. Bref, je passerai sous silence cet épisode digne d'un reportage d'enquête exclusive... Merci de m'avoir encadrée, supportée et épaulée pendant ma thèse.

Jean-Marie, les mots me manquent, tu vas sûrement penser que c'est trop rare...

Ma thèse a été une expérience riche en émotion. Mais je ne retiendrai que le positif car tu as toujours été présent, à l'écoute et plein de bons conseils. Toujours le mot pour rire, grâce à toi j'ai peaufiné mon sens de l'humour et de l'humeur. J'ai appris également que l'on peut rire de tout mais pas avec n'importe qui. Merci encore d'avoir eu confiance en moi.

Je tenais également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce projet: Philippe Faure, Sébastien Malpel, Jean-Philippe Charles, François Bousquet, Stéphane Dupas, Georges Alves et Gérard Manière et surtout Isabelle Chauvel.

Isabelle, ma chère maman d'adoption, merci pour ton soutien et ta patience. Merci de m'avoir fait découvrir l'art de la communication « être humain-confocal », l'hybridation *in situ* et

le Western blot. Que de bons moments partagés ensemble. Promis, je reviendrai très vite pour notre virée shopping. Tu fais partie de ces personnes qui ont compté et qui ont rendu cette expérience inoubliable.

Monsieur Dupas, promis, dès que j'ai fini ma thèse, nous irons écouter les cerfs bramer, bien que ça ne m'emballe pas beaucoup... Vous avez été ma muse et parfois mon souffre-douleur. Nos joutes verbales vont me manquer. Si nous avions organisé les jeux olympiques de la vanne, vous auriez sûrement obtenu la médaille d'or pour la vanne la plus pourrie... Vous êtes bon public Mr D, ne changez pas !!!

Je tenais à remercier l'ensemble des membres du laboratoire, pour les bons moments passés ensemble. Merci de m'avoir accompagné pendant cette aventure.

A mon partenaire de thèse, ma moitié professionnelle, Justin, je n'aurais pas eu envie de faire ma thèse avec quelqu'un d'autre. J'ai beaucoup appris à tes côtés, surtout à relativiser et à ne plus m'inquiéter pour rien, enfin presque... et j'ai découvert, que le désordre pouvait être ordonné. Je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras car tu le mérites et au fait, si tu croises Pedro dans la biblioteca, tu m'appelles !

Je tiens à remercier les post-docs, thésards et les étudiants pour les bons moments partagés. Note spéciale pour Ismail et Mégane, bon courage pour la fin de votre thèse, de toute manière il va falloir y passer un jour. Arièle, ton enthousiasme m'a convaincu de signer. Même de l'autre côté de l'océan atlantique, tu as toujours su trouver les mots justes pour me remotiver. Merci d'être là.

A mes ami(e)s thésards, Véronique, Claire, Charlie, Déborah, Alexandrine, Marie-Aure, Mika et Matt, merci pour votre soutien quotidien, merci de m'avoir détournée si souvent de mon travail (pour mon bien psychologique). Nos « after work », à refaire le monde, vont me manquer. Si j'ai terminé cette thèse, c'est aussi grâce à vous. Merci aux auxerrois, Sully, Jess, Marion, Thomas d'avoir été présents, vous êtes les meilleurs.

Enfin, je tenais à remercier ma famille, mes parents et mes frères, malgré les épreuves de la vie, vous avez toujours eu une confiance inconditionnelle en moi. Vous m'avez toujours encouragée et épaulée dans mes choix personnels et professionnels. Vous m'avez appris le sens de la famille et celui du travail. Cette thèse est aussi la vôtre (bien que papa aurait préféré que je travaille sur les pigeons....). C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui, et pour cela, je ne pourrai jamais assez vous remercier.

J'ai promis de faire des remerciements courts, du moins plus courts que ceux d'Arièle, alors je vais conclure.

A toi, le jeune, qui tient cette bible entre tes mains. Si tu t'apprêtes à lire ces quelques lignes, c'est que tu as sûrement signé pour un stage ou encore mieux, une thèse avec Jean-Marie et Stéphane... Alors voici quelques petits conseils !

Ne regrette pas, de toute manière c'est trop tard, tu as signé ! Dis-toi qu'on apprend de ses erreurs. Mais non pas de panique, c'est de l'humour mon petit, tu as bien fait. Tu t'apprêtes à découvrir le monde de la science, de l'enseignement, les rouages d'un laboratoire, apprendre à te connaître et surtout à devenir une machine de guerre, usiner weekends et vacances pour le plaisir de faire avancer la science. Tu vas apprendre à aimer et à haïr ta thèse mais ne t'inquiète pas, elle te le rendra bien... ou pas !

Avant tes réunions avec les grands patrons, arme-toi d'un gramme de doliprane, d'un bon café et de tout l'humour que tu possèdes. Si tu ne comprends pas les blagues de Jean-Marie, c'est normal, il faut toujours un temps d'adaptation. Fais semblant de trouver ça drôle... Par contre, si Stéphane a un mouvement de sourcil réprobateur, c'est que tu as dit une connerie, mais ne t'inquiète pas, ça ne sera ni la première ni la dernière fois. Conseil supplémentaire, il est toujours utile de bien s'entendre avec l'ACMO !! Et pour motiver les troupes, les gâteaux maisons sont toujours les bienvenus.

Courage à toi le jeune, fais-leur et fais-toi confiance avec cette « Dream team », tu ne peux que réussir.

Table des matières

Liste des figures et tables	VII
Abréviations	X
Avant-Propos	1
Introduction bibliographique	1
Chapitre 1: Organisation du système gustatif chez <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1- Organisation générale du système chimiosensoriel chez les insectes	5
1.1- Le système gustatif chez <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.1.1- L'architecture du système gustatif.....	5
1.1.2- Les sensilles gustatives	7
1.1.3- Les neurones gustatifs.....	9
1.1.4- Les récepteurs gustatifs.....	10
2- Modalités gustatives détectées par les récepteurs gustatifs du proboscis	11
2.1- Les récepteurs aux sucres	11
2.2- Les récepteurs aux substances aversives	11
2.2.1- Les récepteurs gustatifs de type GR.....	11
2.2.2- Les récepteurs gustatifs de type TRP	15
2.3- Suppression de la modalité sucrée par des molécules aversives	17
2.4- Les récepteurs à l'umami.....	17
2.5- Les récepteurs à l'acide et au sel	18
3- Les molécules sensorielles non conventionnelles détectées par les récepteurs gustatifs du proboscis.....	19
4- Modalités gustatives détectées par les récepteurs gustatifs dans les autres organes gustatifs	20
4.1- Les récepteurs gustatifs dans les pattes	20
4.2- Les récepteurs gustatifs dans l'antenne	23
5- Détection de stimuli internes par les récepteurs gustatifs	23
6- Détection de stimuli non gustatifs par les récepteurs gustatifs.....	25
7- Transduction du signal	25
8- Projection des neurones gustatifs	27
9- Plasticité du système gustatif aversif.....	27
Chapitre 2: Enzymes du métabolisme des xénobiotiques.....	29
2- Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques	29
2.1- Généralités.....	29
2.2- Le métabolisme des xénobiotiques	31

2.2.1- Les enzymes de phase I ou de fonctionnalisation.....	31
2.2.1.1- Les Cytochromes P450 (CYP)	33
2.2.1.1.1- La superfamille des CYP: le clade des CYP mitochondriaux.....	34
2.2.1.1.2- La superfamille des CYP: le clade 2.....	34
2.2.1.1.3- La superfamille des CYP: le clade 3.....	35
2.2.1.1.4- La superfamille des CYP: le clade 4.....	36
2.2.2- Les enzymes de phase II ou de conjugaison.....	37
2.2.3- Les transporteurs de phase III ou d'excrétion	37
2.3- Régulation de l'expression des EMX	38
2.4- Expression et localisation.....	39
2.4.1- Localisation tissulaire.....	39
2.4.2- Expression cellulaire.....	40
Chapitre 3: Evènements péri-récepteurs: molécules chimiosensorielles et enzymes du métabolisme des xénobiotiques.....	41
3- Les évènements péri-récepteurs	41
3.1- Les protéines de transport: odorant binding proteins (OBP)	41
3.2- Les enzymes de dégradation: odorant degrading enzymes (ODE)	46
3.2.1- Les ODE peuvent être exprimées spécifiquement dans les tissus sensoriels	47
3.2.2- Affinité des molécules odorantes pour les EMX sensorielles.....	49
3.2.3- Les EMX et l'arrêt du signal sensoriel.....	50
Chapitre 4: La caféine - Propriétés, Actions et Métabolisme	55
4- Généralités	55
4.1- Propriétés.....	55
4.1.1- Effets de la caféine chez les mammifères	55
4.1.2- Toxicité de la caféine.....	57
4.2- Effets de la caféine sur les insectes.....	57
4.2.1- Caféine: une molécule toxique	57
4.2.2- Caféine – un répulsif naturel: interactions Plantes / Prédateurs.....	58
4.3- Caféine: Interactions – Plantes / Plantes	59
4.4- Effets de la caféine sur la physiologie de l'insecte.....	59
4.4.1- Rôle de la caféine sur la locomotion et le sommeil.....	59
4.4.2- Les effets de la caféine sur l'apprentissage et la mémoire	60
4.5- Mode d'action	61
4.6- Métabolisme de la caféine	66
4.6.1- Les propriétés pharmacocinétiques de la caféine	66
4.6.2- Le métabolisme de la caféine.....	69

Chapitre 5: Objectifs et Stratégie	75
5.1- Approche chimiosensorielle.....	75
5.2- Approche métabolique	76
Résultats.....	79
Chapitre 6: Résultats	80
Partie 1- Identification d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) dans les organes sensoriels et le corps dont l'expression est modulée par une exposition à la caféine	80
1- Étude transcriptomique (Agilent Microarray).....	80
1.1- Expression dans les appendices sensoriels	80
1.2- Expression dans l'abdomen et le thorax (corps)	82
1.3- Comparaison de l'expression des EMX dans les appendices et le corps.....	84
Partie 2- Approche chimiosensorielle: rôle des Cytochromes P450 dans la perception sensorielle de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	90
2- Analyse des conséquences de la diminution de l'expression des CYP candidats par ARN interférent sur la perception de la caféine.....	90
2.1- Sélection des lignées RNAiCYP	90
2.2- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans l'ensemble des neurones sensoriels	92
2.3- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans les corps pédonculés (Mushroom Bodies) sur la perception de la caféine	94
2.4- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans les neurones gustatifs sensibles à la caféine Gr66a.....	96
2.5- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la dérégulation de l'expression de CYP6d5 par un élément P	100
2.6- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression de CYP6d5 dans les cellules accessoires	102
2.7- Distribution de CYP6D5 dans proboscis de <i>Drosophila melanogaster</i>	104
2.7.1- Profil d'expression de CYP6D5	104
2.7.2- Localisation cellulaire de CYP6D5 dans le proboscis	106
2.7.2.1- Expression de CYP6D5 dans les neurones sensoriels du proboscis	106
2.7.2.2- Expression de CYP6D5 dans les cellules accessoires du proboscis	108
Partie 3- Approche métabolique: rôle des CYP dans le métabolisme de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	110
3.1- Approche métabolique par spectrométrie de masse.....	110
3.1.1- Identification de métabolites de la caféine par spectrométrie de masse.....	112
3.1.2- Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine par spectrométrie de masse	112
3.2- Régulation transcriptionnelle des CYP par la caféine.....	110
3.3- Approche métabolique par chromatographie sur couche mince	110
3.3.1- Caractérisation du métabolisme de la caféine chez la drosophile	110

3.3.2- Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine.....	110
3.3.3- Quantification des métabolites de la caféine	110
3.4- Rôle fonctionnel des CYP dans le métabolisme de la caféine	110
3.4.1- Rôle de <i>CYP6d5</i> dans le métabolisme de la caféine.....	110
3.4.2- Rôle de <i>CYP6a8</i> dans le métabolisme de la caféine.....	110
3.4.3- Rôle de <i>CYP12d1</i> dans le métabolisme de la caféine	112
Discussion et Perspectives.....	113
Chapitre 7: Discussion / Perspectives.....	124
Partie 1: Intérêt de l'étude transcriptomique	124
Partie 2: Perception sensorielle de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	125
2.1- La caféine induit l'expression d'EMX dans les organes sensoriels (antennes / pattes/ ailes/ proboscis) chez <i>Drosophila melanogaster</i>	125
2.2- La perception de la caféine peut être perturbée par une diminution de l'expression des CYP dans les organes sensoriels	124
2.2.1- Ciblage des neurones sensoriels (<i>neuralized</i> -GAL4 ; <i>MB247</i> -GAL4 et <i>Gr66a</i> -GAL4)	125
2.2.2- Etude de la dérégulation de <i>CYP6d5</i> via la lignée élément P (26475).....	126
2.2.3 Ciblage dans les cellules accessoires (<i>Cut</i> -GAL4).....	125
2.3- Localisation de <i>CYP6d5</i> par hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie	126
2.4- Rôle de <i>CYP6d5</i> dans la perception sensorielle de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i> ..	125
Partie 3: Métabolisme de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	134
3.1- La caféine induit une régulation de l'expression d'EMX dans le corps (abdomen /thorax).....	134
3.2- Caractérisation du métabolisme de la caféine	135
3.3- Implication de <i>CYP12d1</i> , <i>CYP6a8</i> et <i>CYP6d5</i> dans le métabolisme de la caféine dans le corps	134
Matériel et Méthodes.....	137
Chapitre 8: Matériel et Méthodes.....	142
1- Matériel.....	142
1.1- Conditions d'élevage des drosophiles	142
1.2- Les lignées utilisées	142
1.2.1- Les lignées contrôles.....	142
1.2.2- Les lignées transgéniques.....	142
1.2.2.1- Système UAS/GAL4.....	142
1.2.2.2- Lignées transgéniques GAL4 utilisées.....	149
1.2.3- Lignées transgéniques UAS ARN interférent utilisées (RNAi).....	149
1.3- Principe de l'ARN interférent.....	151
1.3.1- Génération des siRNA.....	151
1.3.2- Activation du complexe RISC.....	151

2- Méthodes	148
2.1- Approche transcriptomique	148
2.1.1- Exposition à la caféine.....	148
2.1.2- Etude transcriptomique	148
2.2- Approche comportementale	150
2.2.1- Tri des individus	150
2.2.2- Test comportemental de gustation MultiCAFE.....	150
2.3- Approches en Biologie Moléculaire.....	151
2.3.1- Séparation / Dissection des tissus	151
2.3.2- Extraction d'ARN totaux.....	148
2.3.3- Dosage spectrophotométrique de l'ARN	149
2.3.4- Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	149
2.3.5- PCR en temps réel ou PCR quantitative (q-PCR).....	149
2.4- Hybridation <i>in situ</i> : synthèse des ribosondes.....	148
2.4.1- Extraction d'ADN génomique.....	148
2.4.2- Réaction d'amplification en chaîne (PCR).....	149
2.4.3- Purification de l'insert.....	149
2.4.4- Ligature	149
2.4.5- Transformation bactérienne.....	149
2.4.6- Analyse des sous-clones	150
2.4.7- Marquage de la sonde ARN (ribosondes).....	150
2.5- Hybridation <i>in situ</i> sur proboscis <i>in toto</i>	150
2.5.1- Préparation des proboscis.....	150
2.5.2- Hybridation <i>in-situ</i>	151
2.5.3- Immunodétection.....	151
2.6- Immunohistochimie.....	148
2.6.1- Production et Test de l'anticorps anti-CYP6D5	148
2.6.2- Traitement des tissus	148
2.6.3- Immunodétection.....	149
2.7- Biochimie.....	149
2.7.1- Extraction de protéines	149
2.7.2- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	150
2.7.3- Western-Blot.....	150
2.7.3.1- Transfert semi-sec et Coloration rouge Ponceau	150
2.7.3.2- Immunodétection	151

2.8- Métabolisme de la caféine: Approche en spectrométrie de masse	148
2.8.1- Produits chimiques.....	148
2.8.2- Exposition des individus à la caféine	149
2.8.3- Préparation des échantillons.....	149
2.8.4- Séparation et analyse des métabolites de la caféine par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	150
2.8.5- Analyse du métabolisme de la caféine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).....	150
2.9- Métabolisme de la caféine: Approche en chromatographie sur couche mince.....	151
2.9.1- Traitement des individus.....	151
2.9.2- Préparation des échantillons.....	148
2.9.3- Comptage et dépôt sur plaque de silice	148
2.9.4- Exposition.....	149
2.9.5- Révélation et analyse des films photographiques	149
Références bibliographiques.....	172

Liste des figures et tables

Figure 1: Organisation du système gustatif chez <i>Drosophila melanogaster</i> .	6
Figure 2: Morphologie des différentes sensilles gustatives.	6
Figure 3: Représentation des différentes sous-familles de sensilles de type (taste bristle) et le nombre de neurones qu'elles portent et leur spécificité de réponse.	8
Figure 4: Cartographie des 6 familles de sensilles gustatives: S-a, S-b, L, S-c, I-a et I-b.	12
Figure 5: Représentation schématique des différentes sous-familles des récepteurs gustatifs sensibles aux molécules aversives dans les 6 classes de sensilles gustatives.	14
Figure 6: Schéma récapitulatif des différentes structures des récepteurs gustatifs chez <i>Drosophila melanogaster</i> nécessaires à la détection de stimuli sensoriels.	16
Figure 7: Cartographie fonctionnelle des sensilles des pattes prothoraciques de la femelle drosophile.	22
Figure 8: Schéma hypothétique de la transduction du signal au niveau des récepteurs gustatifs chez <i>Drosophila melanogaster</i> .	24
Figure 9: Carte d'activité des récepteurs gustatifs Gr5a et Gr66a dans le ganglion sous-œsophagien (SOG).	26
Figure 10: Schéma général des 3 phases du métabolisme des xénobiotiques.	30
Figure 11: Mode d'action des Cytochromes P450 (CYP).	32
Figure 12: Mécanisme d'action proposé pour la détection de la phéromone cis-vacényl acétate par les SNMP.	44
Figure 13: Représentation de la localisation et des interactions entre les protéines, participant aux événements péri-récepteurs, présentes dans la lymphe sensillaire et au niveau du neurone sensoriel d'insecte.	53
Figure 14: Mode d'action de la caféine chez les mammifères et chez les insectes.	63
Figure 15: Distribution et quantification de la teneur en caféine des différents breuvages ou des produits largement consommés.	67
Figure 16: Métabolisme hépatique de la caféine chez l'Homme et le Rat: Contribution des différentes isoformes de CYP.	68
Figure 17: Voies de dégradation de la caféine chez les mammifères.	72
Figure 18: Gènes impliqués dans les événements péri-récepteurs dont l'expression est modulée par une exposition à la caféine dans les appendices sensoriels. Les gènes dont l'expression augmente sont indiqués en rouge et ceux dont l'expression diminue sont indiqués en bleu. Cut off=+/-2, P value <0,001 (***)	79
Figure 19: Gènes impliqués dans les événements péri-récepteurs dont l'expression est modulée dans le corps par une exposition à la caféine.	81
Figure 20: Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant des EMX (CYP, GST, UGT et transporteurs) dont l'expression est modulée dans les appendices sensoriels et le corps après 12 heures d'exposition à la caféine chez la drosophile mâle adulte.	85
Figure 21: Comparatif des gènes codant des CYP dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.	85
Figure 22: Comparatif des gènes codant des enzymes de phase II de types Glutathionne-S-transférases (GST) et UDP-glycosyltransférases (UGT) dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.	85
Figure 23: Comparatif des gènes codant des transporteurs de phase III dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.	85

Figure 24: Modulation du niveau d'expression de l'expression des gènes CYP candidats (CYP12d1, CYP6a8, CYP6d5, CYP4d14 et CYP4d1) dans le corps entiers des individus RNAiCYP/Actine-GAL4.	87
Figure 25: Profil d'expression de Neuralized-GAL4 (neur-GAL4).	91
Figure 26: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées RNAiCYP/ Neuralized-GAL4 et de leurs témoins RNAiCYP/+ et Neuralized-GAL4/+ pour les candidats CYP12d1, CYP6a8, CYP6d5, CYP4d14 et CYP4d1.....	91
Figure 27: Modulation du niveau d'expression des CYP dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAiCYP/Neuralized-GAL4.	93
Figure 28: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées RNAiCYP/ MB247-GAL4 et de leurs témoins RNAiCYP/+ et MB247-GAL4/+... ..	93
Figure 29: Modulation du niveau d'expression des CYP dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAiCYP/ MB247-GAL4.....	95
Figure 30: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées RNAiCYP/ Gr66a-GAL4 et de leurs témoins RNAiCYP/+ et Gr66a-GAL4/+.....	95
Figure 31: Modulation du niveau d'expression des CYP dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAiCYP/ Gr66a-GAL4.	97
Figure 32: Implication de CYP6d5 dans la perception de la caféine.....	99
Figure 33: Influence de la diminution de l'expression de CYP6d5 dans les cellules accessoires (Cut) dans les organes sensoriels d'individus mâles adultes.	101
Figure 34: Profil d'expression de CYP6D5 dans le proboscis.....	103
Figure 35: Expression de CYP6d5 sur proboscis in toto de drosophiles mâles exposés à la caféine pendant 12 heures.	104
Figure 36: Profil d'expression de la protéine CYP6D5 dans les neurones sensoriels au niveau des poches sensillaires du proboscis de drosophile mâle exposés à la caféine.....	105
Figure 37: Profil d'expression de CYP6D5 dans les cellules accessoires au niveau des poches sensillaires du proboscis de drosophile mâle exposés à la caféine.....	107
Figure 38: Proportions relatives de théobromine, paraxanthine et théophylline formés.....	111
Figure 39: Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine.	111
Figure 40: Métabolisme de la caféine.....	111
Figure 41: Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine.	110
Figure 42: Comparaison des proportions relatives des 4 métabolites majoritaires entre la drosophile (<i>Drosophila melanogaster</i>), l'Homme (<i>Homo sapiens</i>) et le rat (<i>Rattus norvegicus</i>).....	110
Figure 43: Rôle de CYP6d5 dans la dégradation de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	111
Figure 44: Rôle de CYP6a8 dans la dégradation de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	111
Figure 45: Rôle de CYP12d1 dans la dégradation de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	111
Figure 46: Schéma hypothétique du mécanisme d'action de CYP6d5 membranaire dans la perception sensorielle de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	124
Figure 47: Schéma hypothétique de l'implication des CYP12d1, CYP6a8 et CYP6d5 dans la voie de dégradation de la caféine chez <i>Drosophila melanogaster</i>	134
Figure 48: Le Système GAL4/ UAS gène rapporteur.....	143
Figure 49: Mécanisme de l'ARN interférence (RNAi).	150
Figure 50: Présentation du dispositif comportemental MultiCAFE.....	149

Tableau 1: Tableau récapitulatif de l'organisation du système gustatif chez *Drosophila melanogaster*. ...8

Tableau 2: Classification des gènes codant les Cytochromes P450 (CYP) chez <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Tableau 3: Comparaison de la contribution de chaque CYP dans la formation des 4 métabolites de la caféine à deux concentrations plasmatiques différentes de caféine: 100µM et 800µM chez le rat.	70
Tableau 4: Tableau comparatif du niveau d'expression de gènes candidats impliqués dans les événements péri-récepteurs dans les appendices sensoriels exposés à la caféine.	80
Tableau 5: Tableau comparatif du niveau d'expression de gènes candidats impliqués dans les événements péri-récepteurs dans le corps après une exposition à la caféine.....	83
Tableau 6: Tableau récapitulatif des CYP dont l'expression transcriptionnelle est induite par une exposition de 12 heures à 18mM de caféine dans le corps de drosophiles mâles adultes. (Données Microarray)	113
Tableau 7: Liste des lignées GAL4 utilisées	149
Tableau 8: Liste des lignées RNAi utilisées	149
Tableau 9: Liste des amorces utilisées en PCR quantitative	150
Tableau 10: Liste des oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes en hybridation <i>in situ</i> ...	148
Tableau 11: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunocytochimie.....	149
Tableau 12: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot	150
Tableau 13: Liste des métabolites standards utilisés.....	148

Abréviations

ABC: ATP-binding cassette	HSP: Heat Shock Protein
ADN: Acide désoxyribonucléique	IR: Ionotropic Receptor
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire	JO: Johnston Organ
AG: Acide gras	LSO: Labral Sense Organ
AhR: Aryl-hydrocarbon Receptor	MB: Mushroom Bodies
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique	MRP: Multidrug Resistance associated Proteins
AMPc-PDE: AMPc-Phosphodiesterase	MRP: Multidrug Resistance associated Protein
AOX: aldéhydes oxydases	MSN: Mecanosensory Neuron
ARN db: Acide ribonucléique double brin	MultiCAFE: Multi Capillary FEeder
ARN: Acide ribonucléique	NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ARNc: ARN complémentaire	Nrf2: F-E2-related factor 2
ARNm: ARN messenger	OBP: Odorant Binding Protein
ATP: Adénosine Triphosphate	ODE: Odor Degrading Enzyme
BCP: 1-bromo-3-chloropropane	OR: olfactory receptor
BSA: Bovine Serum Albumin	ORN: olfactory receptor neuron
CAR: Constitutive Androstane Receptor	PR: Proboscis Retraction
CCM: chromatographie sur couche mince	PBP: pheromone-binding protein
cMOAT: canicular Multispecific Organic Anion Transporter	PCR: Polymerase Chain Reaction
CNS: central nervous system	PER: Proboscis Extension Reflex
CSP: chemosensory protein	PLC: Phospholipase C
cVA: cis-vacényl-acétate	IP: Indice de préférence
CYP: Cytochromes P450	IR: ionotropic receptor
DCSO: Dorsal Cibarial Sense Organ	PLC: Phospholipase C
DEG/ENaC: Degenerin/epithelial sodium channel	PXR: Pregnane X Receptor
DMQ: 1,3-dimethyl-2,4-(1H, 3H)-quinazolinedione	q- PCR : PCR quantitative
DMST: delayed-match-to-sample	REST: Relative Expression Software Tool
DNase I: Désoxyribonucléase I	RISC: RNA-induced silencing complex
EDTA: Acide diaminotétracarboxylique	RNAi: ARN interférent
EMX: Enzyme du métabolisme des Xénobiotiques	RNase: Ribonucléase
FAD: Flavine adénine dinucléotide	RT-q-PCR: Reverse transcription- quantitative
FMN: Flavine mononucleotide	SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
GABA: Gamma-Amino Butyric Acid	siRNA: small interfering RNA
GFP: Green Fluorescent Protein	SNMP: sensory neuro membrane protein
gOBP: general-Odorant Binding Protein	SOG: Subesophageal ganglion
GPCR: G Protein-Coupled Receptor	TMC: trans-membrane channel
GR: Gustatory Receptor	TRIS: Trishydroxyméthylaminométhane
GRN: Gustatory Receptor Neuron	TRP: transient receptor potential
GST: Glutathione-S-Transférase	UAS: Upstream Activator Sequence
HIS: Hybridation <i>in situ</i>	UGT: Uridine diPhosphate Glucuronosyl-Transférase
HPLC: High Performance Liquid Chromatography	VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center
	VCSO: Ventral Cibarial Sense Organ

Avant-Propos

Les insectes ont développé des systèmes de communication avec leur environnement, indispensables à leur survie et leur reproduction. Les systèmes chimiosensoriels gustatifs et olfactifs détectent et transmettent au niveau central les informations chimiques de l'environnement, afin que l'insecte distingue les sources alimentaires des substances toxiques, reconnaisse ses proies de ses congénères et sélectionne ses partenaires sexuels.

Afin d'être efficace, le système gustatif doit être sensible et discriminant et pour cela, il doit mettre en jeu des mécanismes rapides et efficaces permettant une élimination rapide des molécules sensorielles afin d'éviter la saturation des récepteurs et ainsi assurer la détection et l'intégration des signaux.

Les événements péri-récepteurs comprennent l'ensemble des protéines autres que les récepteurs capables d'interagir avec les molécules sensorielles et dont la localisation et la fonction sont compatibles avec une modulation de la détection. Ces processus permettent l'entrée, la sortie, le transport ou la demi-vie de ces molécules dans l'environnement des récepteurs. L'environnement direct des récepteurs comprend la lymphe sensillaire mais également le cytoplasme des neurones et des cellules accessoires dans lequel les molécules sensorielles peuvent pénétrer compte tenu de leur caractère souvent lipophile.

Présentes dans l'espace péri-récepteur, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), impliquées principalement dans la détoxification, pourraient avoir un rôle crucial dans la modification et / ou l'arrêt du signal sensoriel en catalysant la biotransformation des molécules sensorielles et en favorisant leurs élimination.

Plusieurs arguments tendent vers cette hypothèse. Depuis une trentaine d'années, plusieurs découvertes ont permis d'étayer le rôle de ces enzymes dans la modulation du signal sensoriel. En effet, chez le mammifère comme chez l'insecte, plusieurs études ont mis en évidence une expression spécifique ou préférentielle de certaines EMX dans les organes sensoriels. De plus, d'autres études *in vitro* et *in vivo* ont montré une implication directe de ces EMX dans la biotransformation de molécules sensorielles et une modulation de la perception.

Afin de mieux comprendre l'implication des EMX dans les processus chimiosensoriels, nous avons tout d'abord étudié, chez *Drosophila melanogaster*, le rôle potentiel d'une classe d'EMX, les cytochromes P450 (CYP), dans la perception sensorielle de la caféine, un insecticide naturel.

Avant-Propos

Chez les mammifères, le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP. Comme les EMX sont généralement inductibles par les composés qu'elles métabolisent, nous avons envisagé ensuite de tirer parti de ce mécanisme pour identifier les CYP potentiellement impliqués dans le métabolisme de la caféine chez les insectes.

Mon travail de thèse a consisté à identifier et caractériser, au niveau moléculaire et fonctionnel, des CYP impliqués dans la modulation de la perception et le métabolisme de la caféine chez la drosophile.

Je débiterai ce mémoire par une synthèse bibliographique présentant l'état actuel des connaissances sur le système gustatif chez les insectes, l'implication des enzymes participant aux événements péri-récepteurs dans la modulation de la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine.

Dans un second temps, je présenterai les objectifs de mon travail de thèse ainsi que la stratégie mise en œuvre pour répondre à notre problématique.

Ensuite, je poursuivrai ce manuscrit en décrivant les résultats obtenus au cours de ce projet concernant l'identification d'EMX impliquées dans la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine par une approche combinant la génétique, la biologie moléculaire, la biochimie et l'étude du comportement.

Enfin, ce manuscrit sera conclu par une discussion des résultats et une présentation des perspectives à court et long terme à envisager.

Introduction bibliographique

Chapitre 1: Organisation du système gustatif chez *Drosophila melanogaster*

1- Organisation générale du système chimiosensoriel chez les insectes

Les insectes évoluent dans un environnement où ils sont en contact permanent avec des molécules volatiles ou solubles pouvant se révéler nocives. Ils ont développé des systèmes de communication sophistiqués, sensibles, efficaces et interconnectés avec leur environnement indispensables à leur survie et leur reproduction. Les systèmes chimiosensoriels gustatifs et olfactifs détectent et transmettent au niveau central les informations chimiques de l'environnement (Hallem *et al.*, 2006, Le Goff *et al.*, 2006) afin que l'insecte distingue les sources alimentaires des substances toxiques, reconnaisse ses proies de ses congénères et de ses partenaires sexuels (Ebbs & Amrein 2007).

A ce jour, contrairement à l'olfaction, la gustation chez l'insecte reste mal comprise, même si les récepteurs gustatifs sont assez bien caractérisés, les mécanismes de transduction du signal restent très controversés. Les insectes répondent aux mêmes modalités gustatives que les mammifères: le sucré, l'amer, le salé, l'acide et l'umami. De plus, diverses études indiquent que le système gustatif des vertébrés et des invertébrés est également capable de répondre à d'autres modalités gustatives telles que le gaz carbonique, l'eau, les phéromones et les acides gras. Toutefois, la gustation chez les insectes n'est pas un système cloisonné et transposable à toutes les espèces.

1.1- Le système gustatif chez *Drosophila melanogaster*

1.1.1- L'architecture du système gustatif

Le système gustatif chez les insectes est complexe et n'est pas restreint à un seul organe. Les sensilles renfermant les récepteurs du goût sont distribuées sur plusieurs organes incluant la partie externe et interne du proboscis ainsi que les pattes, la marge de l'aile et l'organe ovipositeur de la femelle (**Figure 1A**) (Stocker 1994, Vosshall & Stocker 2007).

La partie externe du proboscis est constituée de deux labella, également appelés palpes labiaux, qui fusionnent au niveau de la partie proximale du proboscis (**Figure 1B**).

Chapitre 1: Le système gustatif

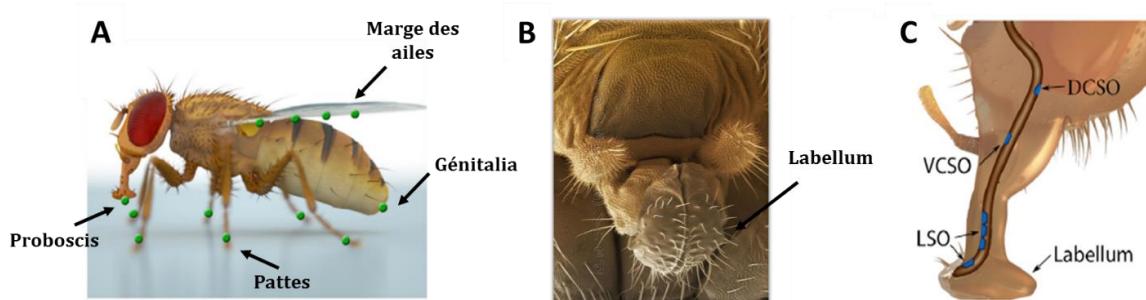


Figure 1: Organisation du système gustatif chez *Drosophila melanogaster*.

(A)- Les points verts indiquent la localisation des organes gustatifs externes de la drosophile: le proboscis, le premier tarse des pattes, la marge des ailes et l'organe ovipositeur chez la femelle (génitalia). (B)- Le proboscis est le principal organe gustatif chez la drosophile. Il est composé de deux labella recouverts de sensilles gustatives. (C)- Le proboscis de la drosophile contient 3 organes gustatifs internes le long de la paroi du pharynx: le LSO, VCSO et le DCSO impliqués dans l'évaluation de la nourriture et le rejet de substances toxiques. Modifié à partir de (Liman *et al.*, 2014).

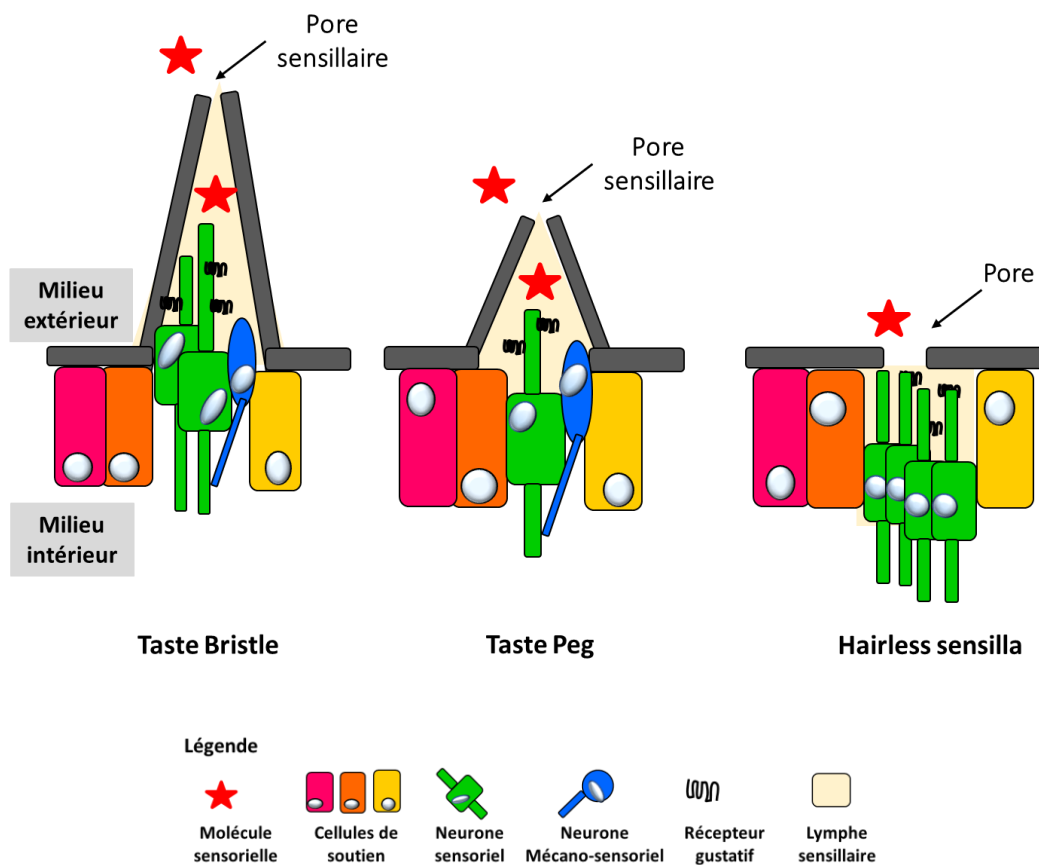


Figure 2: Morphologie des différentes sensilles gustatives.

Les sensilles sont recouvertes de cuticule et présentent un pore à travers lequel les molécules sensorielles pénètrent. Elles vont activer les récepteurs gustatifs portés par les neurones sensoriels dont l'axone projette dans le système nerveux central. Il existe 3 types de sensilles caractérisées par leur taille, leur morphologie, leur localisation et le nombre de neurones sensoriels et mécanosensoriels qu'elles abritent. On distingue les sensilles à cil long (taste bristle), les sensilles avec un cil plus court (taste peg) et les sensilles sans cil (hairless sensilla).

Des sensilles gustatives ont été identifiées dans le pharynx formant 3 organes distincts et alignés le long de la paroi du pharynx: l'organe sensitif du labre et les organes cibariaux ventraux et dorsaux (VCSO, DCSO). Ces organes seraient impliqués dans l'ingestion et la régurgitation des substances toxiques (**Figure 1C**) (Stocker 1994).

Les sensilles de l'ovipositeur seraient impliquées dans le choix du site de ponte. Le rôle des récepteurs du goût au niveau du proboscis et des pattes peut être facilement illustré toutefois, le rôle des récepteurs du goût au niveau de la marge des ailes reste encore énigmatique. Une hypothèse a été avancée concernant un rôle éventuel de ces récepteurs dans le nettoyage de l'animal et l'exploration de l'environnement (Amrein & Thorne 2005, Stocker 1994).

1.1.2- Les sensilles gustatives

Les organes chimiosensoriels sont recouverts de cils (sensilles) qui abritent les neurones portant les récepteurs gustatifs (GRN). Les sensilles gustatives présentent un pore terminal à travers lequel les molécules sensorielles peuvent pénétrer et activer les GRN. Trois types de sensilles ont été répertoriées et se différencient par leur taille, leur morphologie et leur localisation: (1) des sensilles gustatives de type trichodea (taste bristle), (2) des sensilles plus courtes et de forme coniques (taste peg appelées aussi papilles) et des sensilles sans poils (hairless sensilla) (Shanbhag *et al.*, 2001b, Stocker 1994) (**Figure 2**).

Chaque structure sensillaire est composée d'un ou plusieurs neurones sensoriels, d'un neurone mécano-sensoriel et de trois types de cellules accessoires: les cellules thormogènes, thécogènes et tricogènes responsables en particulier de la production et de la sécrétion de la lymphe sensillaire (Amrein & Thorne 2005) (**Figure 2**).

Les sensilles de type « taste bristle » localisées sur les labella du proboscis sont caractérisées par leur taille et on dénombre 3 familles: L (longue), I (intermédiaire) et S (courte). Ces différentes sensilles ne possèdent pas le même nombre de neurones. Les sensilles de type L et S abritent 4 neurones alors que les sensilles de type I abritent 2 neurones (Amrein & Thorne 2005, Montell 2009).

Chapitre 1: Le système gustatif

Tableau 1: Tableau récapitulatif de l'organisation du système gustatif chez *Drosophila melanogaster*.

Les organes gustatifs de la drosophile sont répartis sur l'ensemble de son corps. Chez les insectes la structure de base de la perception sensorielle est la sensille qui abrite des neurones sensoriels (GRN) et mécano-sensoriels (MSN) portant des récepteurs. Ces récepteurs, une fois activés par des molécules sensorielles, vont pouvoir induire une réponse comportementale (Montell 2009).

Localisation	Nom de l'organe	Nombre / Type sensille	GRNs	MSNs
Proboscis	Palpes labiaux (Labella)	31 sensilles		
		9 sensilles L (longues)	4	1
		10 sensilles I (intermédiaires)	2	1
		12 sensilles S (courtes)	4	1
Pharynx	LSO Organe sensitif du labre	30-40 pegs	1	
		*	8	
		*	1	1
	VCSO Organe cibariale ventral	*	1	1
		3 sensilles Proximale	2	
		Médian	2	
	DCSO Organes cibariale dorsal	Distale	4	
		2 sensilles Postérieure	3	
Pattes	Mâles- Pattes prothoraciques	Antérieure	3	
	Femelles- Pattes prothoraciques			
	2ème paire	50 sensilles	2-4	1
	3ème paire	37 sensilles	2-4	1
Ailes		30 sensilles	2-4	1
Génitalia		32 sensilles	2-4	1
		40 sensilles	4	1
		10 sensilles	?	?

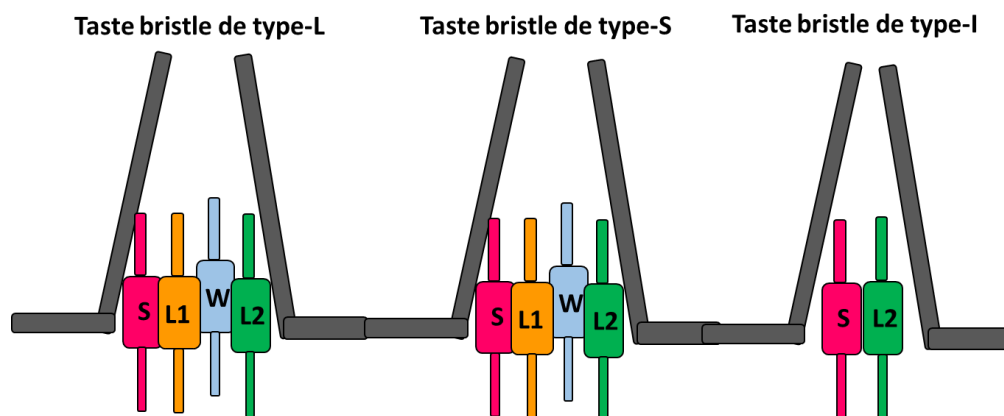


Figure 3: Représentation des différentes sous-familles de sensilles de type (taste bristle) et le nombre de neurones qu'elles portent et leur spécificité de réponse.

Classiquement, 3 sous-familles de sensilles de type taste bristle sont répertoriées au niveau du proboscis. Les sensilles de type L et S, composées de 4 GRN distincts, répondent aux sucres (S), à l'eau (W), aux faibles (L1) et aux fortes (L2) concentrations de sel et / ou aux molécules aversives, alors que les sensilles de type I, composées de 2 GRN répondent à des stimuli attractifs (sucres, faible concentration de sel - S) et à des stimuli répulsifs (molécules aversives et forte concentration en sel - L2)(Ebbs & Amrein 2007, Hiroi *et al.*, 2004).

Chaque labellum du proboscis portent 31 sensilles gustatives de type « taste bristle » intercalées avec 30 à 40 « taste peg » qui abritent un neurone chimiosensoriel et un neurone mécano-sensoriel. Ces sensilles sont impliquées dans le contrôle de la qualité de la nourriture et des liquides avant l'ingestion. Des sensilles gustatives de type «hairless sensilla» ont également été répertoriées au niveau des organes du pharynx. Le LSO regroupe 9 sensilles dont 3 sont des sensilles gustatives et portent au total 10 GRN, le VCSO compte 3 sensilles avec 8 GRN et le DCSO abrite 2 sensilles avec 6 GRN. Ces organes internes sont peu étudiés mais sont probablement responsables de l'évaluation de la qualité des substances ingérées avant le transit dans les organes digestifs et le rejet des substances nocives (Montell 2009, Stocker 1994) (**Tableau 1**).

Les pattes sont également couvertes des sensilles gustatives abritant entre 2 et 4 GRN. La première paire de patte (pattes prothoraciques) porte 50 sensilles chez le mâle et 37 sensilles chez la femelle. Il a été respectivement dénombré 30 et 32 sensilles gustatives sur la seconde et troisième paire de pattes pour les deux sexes. Le dimorphisme sexuel au niveau des pattes prothoraciques (50 sensilles *versus* 37 sensilles) peut être expliqué par la présence chez le mâle de sensilles spécifiques à la détection de phéromones sexuelles de la femelle impliquées dans le comportement de cour du mâle (Bray & Amrein 2003). La marge des ailes est décorée de 40 sensilles contenant 4 GRN et l'organe ovipositeur de la femelle porte 10 sensilles présentant la morphologie de sensilles gustatives mais très peu caractérisées (Amrein & Thorne 2005, Dahanukar *et al.*, 2005, Montell 2009, Vosshall & Stocker 2007) (**Tableau 1**).

1.1.3- Les neurones gustatifs

Chaque neurone gustatif présente une spécificité de réponse électrophysiologique par rapport au sucre, au sel, à l'eau ou aux substances aversives, ce qui a conduit à la distinction de 4 classes de GRN: S (principalement mono-, di- et tri-saccharides), L1 (sel à faible concentration), L2 (sel à forte concentration et substances aversives) et W (eau) (**Figure 3**) (Amrein & Thorne 2005, Hiroi *et al.*, 2004, Inoshita & Tanimura 2006).

De plus, chaque sensille abrite des neurones (L1 et L2) ayant des réponses antagonistes (Hiroi *et al.*, 2004) ce qui montre que les expériences doivent être menées au niveau des neurones et non au niveau de la sensille.

Chapitre 1: Le système gustatif

Classiquement les sensilles de type L et S, composées de 4 GRN distincts, répondent aux sucres, à l'eau, aux faibles et aux fortes concentrations de sel et ou aux molécules aversives, alors que les sensilles de type I, composées de 2 GRN répondent à des stimuli attractifs (sucres, faible concentration de sel) et à des stimuli répulsifs (molécules aversives et forte concentration en sel) (**Figure 3**) (Ebbs & Amrein 2007, Hiroi *et al.*, 2004).

1.1.4- Les récepteurs gustatifs

Tout comme les mammifères, les insectes détectent un répertoire de modalités sensorielles gustatives (l'amer, le sucré, l'umami, l'acide et le salé). Diverses études ont permis d'identifier 62 gènes codant 68 récepteurs gustatifs par épissage alternatif chez la drosophile. Ces récepteurs gustatifs ont une structure à 7 domaines transmembranaires de 550 à 650 acides aminés et présentent entre 15 et 25 % d'homologie (Clyne *et al.*, 2000, Dunipace *et al.*, 2001, Robertson *et al.*, 2003, Scott *et al.*, 2001).

Longtemps considérés comme des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR), les récepteurs gustatifs de la drosophile ne partagent aucune séquence commune avec les GPCR des mammifères. La différence ne s'arrête pas là, en effet, les récepteurs gustatifs de la drosophile possèdent 7 domaines transmembranaires avec une topologie inversée par rapport à celle retrouvée chez les mammifères. Le domaine C-terminal de la protéine se trouve à l'extérieur de la cellule alors que côté N-terminal est situé du côté cytoplasmique. Les récepteurs gustatifs (GR) partagent une homologie de séquence importante avec les récepteurs olfactifs, ce qui laisse penser que les récepteurs gustatifs pourraient également former des canaux ionotropiques directement activés par le ligand mais aussi par la voie de signalisation liée aux protéines G (Sato *et al.*, 2011).

Des études fonctionnelles ont permis de classer les récepteurs gustatifs en 8 familles: les récepteurs aux sucres, aux molécules amères, aux sels, à l'eau (faible osmolarité), au gaz carbonique (CO₂), à l'acide, à l'umami et aux phéromones.

2- Modalités gustatives détectées par les récepteurs gustatifs du proboscis

2.1- Les récepteurs aux sucres

Les insectes sont attirés par les molécules sucrées tels que les disaccharides (sucrose et maltose) et oligosaccharides. Les récepteurs aux sucres appartiennent à la superfamille des GR. Le premier GR répondant aux sucres à avoir été identifié est Gr5a, responsable de la réponse au tréhalose (Dahanukar *et al.*, 2001, Dahanukar *et al.*, 2007, Ueno *et al.*, 2001). Des études électrophysiologiques et comportementales ont montré que l'invalidation de Gr5a n'affecte pas la réponse des GRN vis-à-vis des autres sucres. Toutefois, l'ablation des neurones gustatifs dans les sensilles de type S affecte la réponse à tous les sucres. Ces études indiquent qu'un neurone exprime différents récepteurs aux sucres.

Chez l'adulte, Gr5a, Gr64a, et Gr64f sont nécessaires et indispensables pour détecter toutes les molécules sucrées, mis à part le fructose (Jiao *et al.*, 2007). Ces récepteurs détectent des sucres de structures différentes, Gr64a par exemple, participe à la réponse au saccharose et au maltose et Gr5a répond au tréhalose. En revanche, Gr64f est considéré comme un corécepteur et la détection du fructose est réalisée par le récepteur Gr43a (Miyamoto *et al.*, 2012).

2.2- Les récepteurs aux substances aversives

2.2.1- Les récepteurs gustatifs de type GR

Chez les insectes, la perception des substances répulsives est très étudiée en raison du rôle qu'elle joue dans la sélection des sources de nourritures, notamment chez les insectes phytophages. Chez les lépidoptères, tel que le papillon *Manduca sexta*, l'activation des neurones sensibles aux substances aversives conduit à une inhibition du comportement d'ingestion (Glendinning *et al.*, 2001). Chez *Drosophila melanogaster*, une étude comparable a permis d'établir le même type de lien entre les neurones répondant à l'amer et les comportements d'aversion envers des substances amères (Meunier *et al.*, 2003).

Les récepteurs gustatifs sensibles aux molécules aversives sont portés par les neurones L2, abrités par les sensilles de types S et I localisées au niveau du proboscis, des pattes et dans le pharynx.

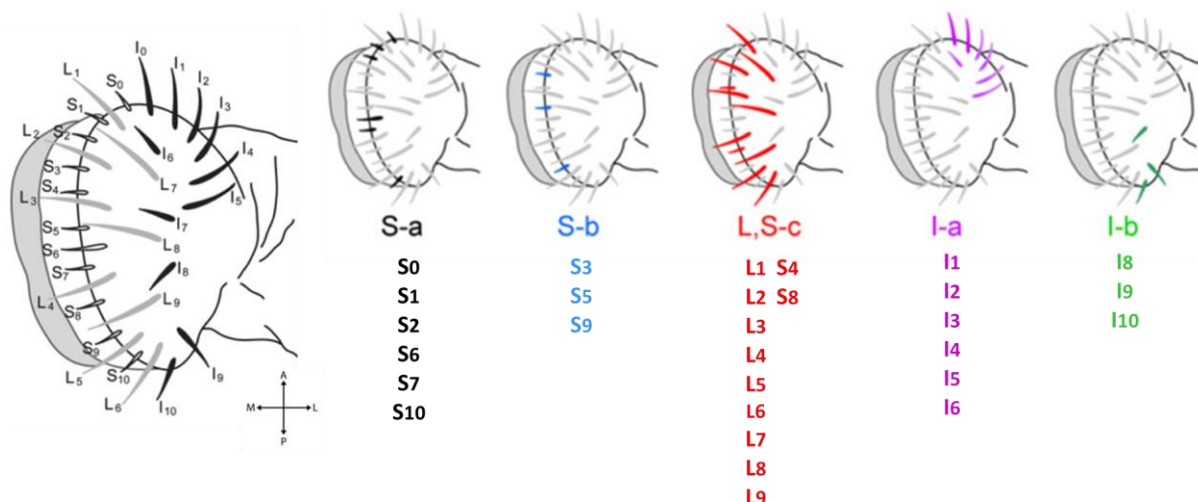


Figure 4: Cartographie des 6 familles de sensilles gustatives: S-a, S-b, L, S-c, I-a et I-b.

L'étude de Weiss et collaborateurs (2011) a permis de classer les récepteurs gustatifs portés par les neurones L2 dans tous les types de sensilles en 6 familles distinctes. Ces sous-familles se différencient selon leur profil d'excitation à un panel de 16 molécules aversives de structures différentes. La sous-famille L répond très faiblement aux stimuli aversifs et est fortement activée par les molécules sucrées. La sous-famille S (S-a et S-b) répond à toutes les molécules aversives testées avec des intensités différentes alors que la sous-famille S-c (sensilles S4, S8) ne répond à aucune des molécules aversives testées. Enfin, la sous-famille I (I-a et I-b) est fortement activée par un nombre limité de molécules aversives (I-a-5 molécules; I-b-4 molécules). Modifié à partir de (Weiss *et al.*, 2011).

L'étude de Weiss (2011) a permis d'effectuer une classification plus précise de la localisation des GR répondant aux molécules aversives. En effet, les récepteurs gustatifs portés par le labellum présentent différentes sensibilités vis-à-vis d'un panel de 16 molécules aversives et 6 groupes de récepteurs gustatifs sensibles aux molécules aversives ont été identifiés: Les GR portés par les sensilles L (groupe 1) répondent très faiblement aux molécules aversives. Les sous-groupes de sensilles I-a (groupe 2) et I-b (groupe 3) répondent à un panel restreint de molécules aversives (**Figure 4**).

En effet, parmi les 16 molécules aversives testées, les sensilles I-a et I-b répondent uniquement à 5 et à 4 molécules avec une excitation supérieure à 10 amplitudes par seconde (spikes/s > 10). En revanche, les sous-groupes S-a (groupe 4) et S-b (groupe 5) répondent à toutes les molécules aversives testées. Par contre, le groupe S-c (groupe 6) constitué des sensilles S₄ et S₈ ne répond à aucune des molécules aversives testées (**Figure 4**).

Il est probablement possible de mettre en évidence d'autres sous-groupes si ces mêmes expériences sont réalisées avec d'autres composés aversifs.

La distribution spatiale de ces GR dans le proboscis a été élucidée en utilisant le système UAS/GAL4 avec un rapporteur UAS-mCD8-GFP. Cette étude a mis en évidence que 38 GR exprimés dans le proboscis, dont 33 GR sont localisés dans les 4 sous-groupes de sensilles sensibles aux molécules aversives (I-a, I-b, S-a et S-b). Il a été remarqué que les sensilles de type S-a (29 GR) et S-b (16 GR), répondant à un plus grand nombre de molécules aversives, abritent un nombre plus important de GR dans les neurones de type L2 que ceux exprimés dans les sensilles des sous-groupes intermédiaires I-a (6 GR) et I-b (10 GR) (**Figure 5**) (Weiss *et al.*, 2011).

Un groupe de 5 GR a été identifié dans toutes les sensilles S et I. L'hypothèse de l'existence d'un éventuel co-récepteur (Gr66a, Gr32a, Gr33a, Gr89a et Gr39a.a) appelé «Core-bitter GR» dont la fonction est assimilée à celle d'Orco (Or83b) dans le système olfactif a été émise (**Figure 5**) (Weiss *et al.*, 2011).

Le rôle de quelques GR a été étudié en utilisant des souches mutantes dont le gène a été éliminé par excision (Lee *et al.*, 2009, Moon *et al.*, 2006). En général, la détection des molécules aversives est assurée par un large répertoire de GR, exprimés dans les neurones de type L2, qui peut être accomplie soit par un complexe de plusieurs récepteurs ou par un seul récepteur.

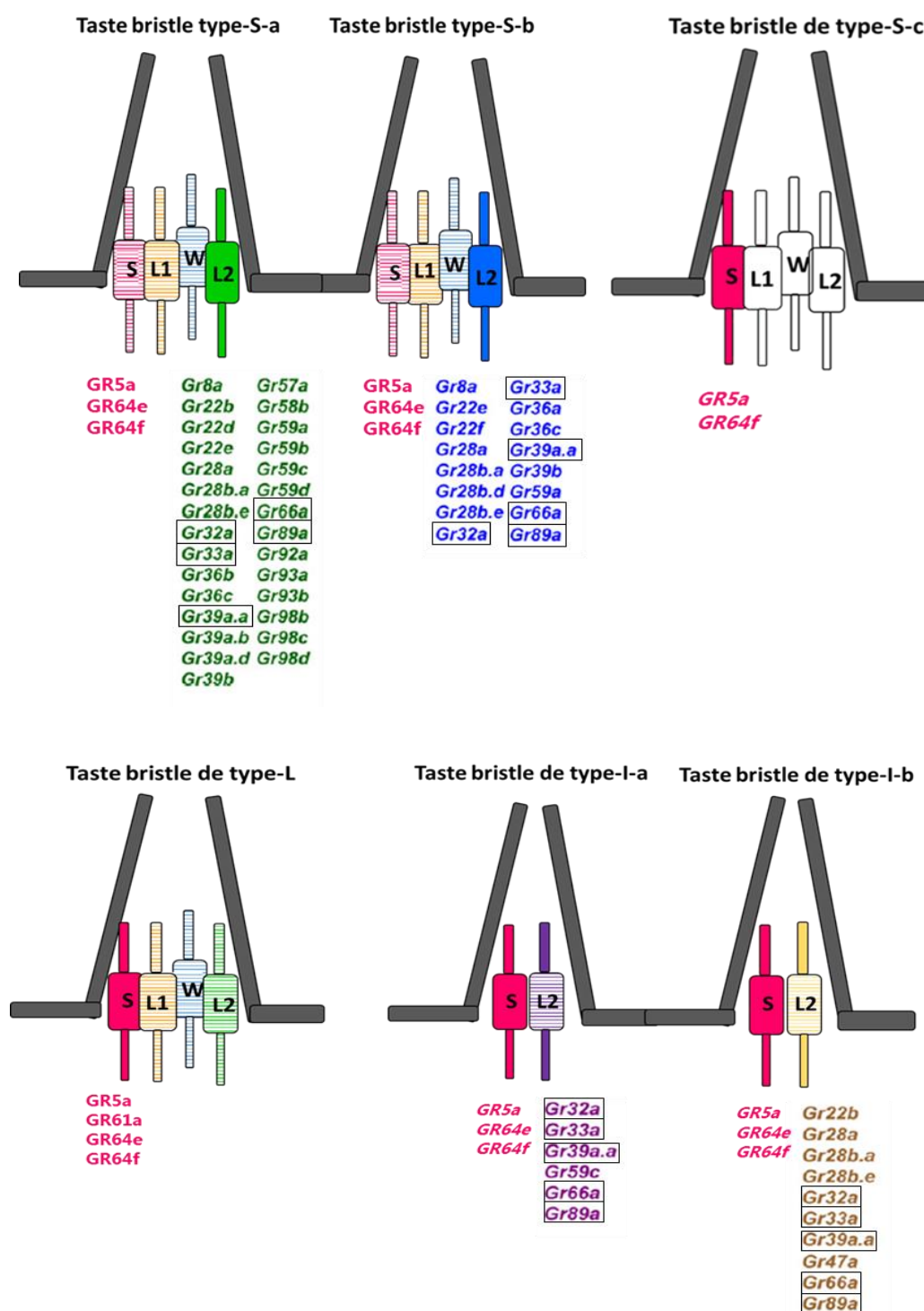


Figure 5: Représentation schématisée des différentes sous-familles des récepteurs gustatifs sensibles aux molécules aversives dans les 6 classes de sensilles gustatives.

L'étude de Weiss (2011) a permis de mettre en évidence 33 GR exprimés au niveau du proboscis ainsi que différentes combinaisons de GR dans chaque type de sensilles. Ils ont également répertorié 5 GR (encadrés) communs à toutes les sensilles (Gr66a, Gr32a, Gr33a, Gr89a et Gr39a.a) suggérant la formation d'un co-récepteur nécessaire à la détection des molécules aversives. Modifié à partir de (Weiss *et al.*, 2011).

Par exemple, des expérimentations comportementales et électrophysiologiques chez *Drosophila melanogaster* ont permis de montrer que la caféine peut être détectée par un complexe hétéromérique composé de 4 récepteurs: Gr66a, Gr33a, Gr32a et Gr93a (Lee *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2009, Moon *et al.*, 2006, Moon *et al.*, 2009). De la même manière, la détection du DEET (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide) est assurée par un complexe hétéromérique différent composé de 3 récepteurs: Gr66a, Gr32a et Gr33a (Lee *et al.*, 2010).

D'autre part, il a été mis en évidence que la détection de la L-canavanine est effectuée par un récepteur orphelin couplé aux protéines Gαo47A, DmXR, codé par le gène *mtt* (mangetout). Ce récepteur est localisé au niveau des sensilles gustatives et est exprimé au niveau des neurones portant les récepteurs Gr66a (Devambez *et al.*, 2013, Mitri *et al.*, 2009).

Différentes associations de sous-unités peuvent expliquer comment un nombre limité de GR peut répondre à un large spectre de molécule avec des structures différentes (**Figure 6**).

2.2.2- Les récepteurs gustatifs de type TRP

La détection des molécules aversives dans le proboscis n'est pas limitée qu'aux GR, 3 canaux à cations TRP (transient receptor potential) ont été identifiés dans le proboscis, contribuant à la détection de molécules aversives. Le canal TRPA1, dont le rôle dans la thermosensation est déjà établi, semble être exclusivement impliqué dans la détection d'un insecticide naturel: l'acide aristolochique (Kim *et al.*, 2010a). Un autre canal TRP « Painless » intervient également dans la détection du wasabi et des isothiocyanates (Al-Anzi *et al.*, 2006). Enfin, le canal TRP-Like, exprimé dans les GR est nécessaire et suffisant pour induire une réponse au camphre (Zhang *et al.*, 2013b).

Les trois canaux à cations TRPA1, Painless et TRP-Like, uniquement activés par leur ligand, ont été associés aux groupes de GR I-a et I-b qui répondent à un nombre restreint de molécules aversives (Zhang *et al.*, 2013b) (**Figure 6**).

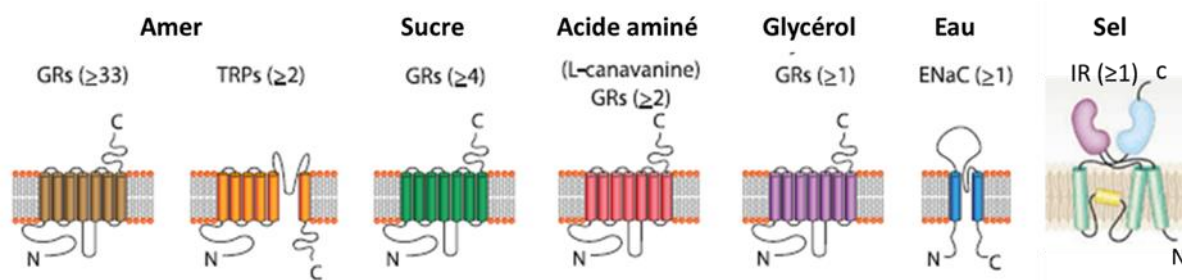


Figure 6: Schéma récapitulatif des différentes structures des récepteurs gustatifs chez *Drosophila melanogaster* nécessaires à la détection de stimuli sensoriels.

Les récepteurs gustatifs partagent une grande homologie avec les récepteurs olfactifs. Comme ces derniers, ils ont 7 domaines transmembranaires avec une topologie inversée avec un domaine N-terminal intracellulaire et un domaine C-terminal extracellulaire capable de former des canaux ioniques pour la transduction du signal. Toutefois, la famille des récepteurs gustatifs s'est élargie depuis quelques années. En effet, d'autres récepteurs capables de détecter des stimuli gustatifs ont été identifiés et répertoriés tels que les canaux ioniques TRP et ENaC respectivement impliqués dans la détection de l'eau et des molécules aversives. Une dernière famille est venue s'ajouter à la liste: les récepteurs IR. Identifiés et caractérisés dans le système olfactif, ces récepteurs homologues des récepteurs ionotropiques au glutamate chez les mammifères seraient impliqués dans la détection des faibles concentrations de sel. Modifié à partir de (Benton 2009, Liman et al., 2014).

2.3- Suppression de la modalité sucrée par des molécules aversives

Dans l'environnement, la nourriture peut être présente sous forme d'un mélange de composés attractifs et répulsifs. Il est nécessaire pour l'animal de faire un tri au niveau central des modalités gustatives détectées. Les composés aversifs déclenchent un comportement de répulsion et entraînent l'arrêt de la prise alimentaire en activant tout d'abord les récepteurs sensibles aux molécules aversives tout en inhibant les récepteurs aux sucres (Meunier *et al.*, 2003).

L'étude de Jeong et ses collaborateurs (2013) a démontré que l'inhibition des récepteurs aux sucres est provoquée par une protéine de transport: OBP49a. Cette protéine est synthétisée puis sécrétée dans la lymphe sensillaire par les cellules accessoires dans les organes gustatifs. L'OBP49a est capable de capter et de transporter la molécule aversive pour qu'elle se fixe sur le GR au sucre Gr64a et d'inhiber son activité. Ce phénomène est qualifié de mécanisme autonome non cellulaire et peut expliquer pourquoi au cours des tests de comportement les individus sauvages ne consomment pas les mélanges sucres – molécules aversives (Jeong *et al.*, 2013).

2.4- Les récepteurs à l'umami

Les adultes détectent les sources d'alimentation contenant des acides aminés et leur consommation est d'autant plus forte s'ils ont été élevés sur un milieu dépourvu en acides aminés (Toshima & Tanimura 2012). La préférence pour les femelles se porte plutôt vers les acides aminés aromatiques et la cystéine tandis que les mâles préfèrent consommer de la leucine et de l'histidine.

Lors d'études d'électrophysiologie, il a été montré qu'aucun des 18 acides aminés standards testés ne stimule les GRN sensibles aux sucres, suggérant la probable implication des « taste peg » dans la détection des acides aminés. A ce jour, aucun GR impliqué dans la détection des acides aminés standards n'a été identifié. Toutefois, la L-canavanine qui est un acide aminé de synthèse toxique provoquant un comportement de répulsion est détecté par le récepteur orphelin DmXR (Mitri *et al.*, 2009) couplé aux protéines G, Gαo47A (Devambez *et al.*, 2013) (Figure 6).

2.5- Les récepteurs à l'acide et au sel

Les modalités gustatives acide et salée sont appelées goût minéral car les stimuli sont généralement des éléments simples, tels que des ions. A ce niveau, il devient compliqué de caractériser les voies de signalisation de ces modalités car l'élément est trop simple et toujours présent contrairement aux stimuli organiques (sucres, molécules aversives).

La perception de la modalité acide est activée au contact d'un soluté à pH acide et par des acides organiques, comme l'acide acétique, qui pénètre par la membrane plasmique. Les insectes préfèrent consommer des sources de nourriture légèrement acides telles que l'eau gazeuse et rejettent la nourriture trop acide. L'étude de Fischler et ses collaborateurs (2007) a montré qu'une consommation d'eau gazeuse entraîne un influx de Na^{2+} au niveau de la région du SOG innervé par les neurones localisés dans les « taste pegs », suggérant ainsi que ces neurones gustatifs pourraient être impliqués dans la détection du CO_2 (Fischler *et al.*, 2007).

Des études comportementales et physiologiques ont montré que le rejet des acides carboxyliques est assuré par une sous-population de GRN à l'amer. De la même manière que les molécules aversives, les molécules acides inhibent l'activité des GRN aux sucres. A ce jour, aucun mécanisme, ni récepteur responsable de la détection des molécules acides n'a été identifié (Charlu *et al.*, 2013).

La détection de la modalité salée est initiée par les ions Na^+ , à des concentrations comprises entre 10 mM et 500 mM mais également par des ions Li^+ et K^+ mais avec un potentiel d'action plus faible. Les sels peuvent être attractifs lorsque leurs concentrations sont inférieures à 100 mM, au-delà ils deviennent répulsifs. La détection du sel chez l'adulte indique une compétition entre deux populations de GRN sensibles au sel. A faible concentration, les sensilles de type L sont plus fortement excitées que les sensilles de type S et I tandis qu'à fortes concentrations, les sels sont perçus comme des molécules aversives et alors les sensilles de type S prennent le relai.

Chez la larve, la détection des faibles concentrations en sel est assurée par deux gènes *ppk11* et *ppk19* codant deux canaux ENaC exprimés dans l'organe terminal (Liu *et al.*, 2003). Toutefois, ces deux gènes ne semblent pas impliqués dans la détection du sel chez l'adulte (Zhang *et al.*, 2013a).

A ce jour, aucun GR impliqué dans la détection du sel n'a été identifié, toutefois il a été montré que le récepteur ionotrope IR76b est responsable de la détection des molécules salées à faible concentration (Zhang *et al.*, 2013a) (**Figure 6**).

Initialement décrits comme une nouvelle classe de récepteur olfactif, les IRs sont également exprimés dans les organes gustatifs. IR76a est exprimé dans des GRN distincts de ceux qui répondent au sucre et à l'amer, la projection dendritique de ces neurones arrive dans une région bien spécifique du SOG (Zhang *et al.*, 2013a). Ce canal est ouvert en continu, il n'est pas activé par un potentiel d'action ou le ligand lui-même. La détection des fortes concentrations en sels chez la drosophile n'est pas connue, toutefois, le canal sodique (Na⁺), TMC-1 (trans-membrane channel like) a été identifié chez *C. elegans* suggérant l'existence d'un canal ionique homologue chez la drosophile (Chatzigeorgiou *et al.*, 2013).

3- Les molécules sensorielles non conventionnelles détectées par les récepteurs gustatifs du proboscis

Les diptères sont également attirés par les acides gras de courtes et longues chaînes (AG) à de faibles concentrations. Même s'ils présentent des propriétés acides, ils sont détectés par les récepteurs portés par les neurones répondant aux sucres. Aucun récepteur aux acides gras n'a été identifié à ce jour mais une phospholipase C (PLC) indiquerait que le mécanisme de transduction des AG impliquerait des récepteurs aux protéines G (GPCR) (Masek & Keene 2013).

Par exemple, la détection du glycérol, résidu central des lipides de la classe des triglycérides et phosphoglycérides, est assurée par le récepteur Gr64e. Ce récepteur appartient au clade S des récepteurs incluant Gr5a, Gr64a et Gr64f (Wisotsky *et al.*, 2011) (**Figure 6**).

L'eau est aussi détectée par le système gustatif de la drosophile, les neurones W sont activés par un soluté de faible osmolarité (Inoshita & Tanimura 2006, Meunier *et al.*, 2009) qui active le complexe DEG/ENaC, constitué d'une protéine, la dégénérine et d'un canal sodique épithélial (*ppk28*), qui semble suffisant pour la détection de l'eau (Cameron *et al.*, 2010) (**Figure 6**).

4- Modalités gustatives détectées par les récepteurs gustatifs dans les autres organes gustatifs

Il y a au moins 3 familles de récepteurs/canaux qui sont capables de détecter des stimuli gustatifs: (1) les récepteurs gustatifs (GR), (2) les récepteurs ionotropiques (IR) et les canaux TRPs. Ces structures portent ce nom à partir du moment où leur fonction est dédiée à la gustation. Mais il existe aussi des GR qui s'expriment ailleurs que dans le proboscis / pharynx et permettent de détecter des molécules gustatives et d'autres stimuli sensoriels. Des récepteurs gustatifs ont été identifiés et répertoriés au niveau des pattes, de la marge des ailes, de l'antenne, du cerveau et sur l'organe ovipositeur. Les GR sont également exprimés dans des neurones afférents dont la fonction a été établie dans la proprioception, hygro-sensation et la thermosensation (Dunipace *et al.*, 2001, Scott *et al.*, 2001, Thorne & Amrein 2008).

4.1- Les récepteurs gustatifs dans les pattes

Deux rôles majeurs des GR ont été identifiés au niveau des pattes: (1) permettre de « goûter » les phéromones sexuelles émises par ces éventuels partenaires (Bray & Amrein 2003). (2) permettre la détection des molécules toxiques dans l'environnement avant de les ingérer via le proboscis.

Ainsi, Gr68a et Gr39a sont exprimés dans les pattes prothoraciques et permettent de détecter les phéromones femelles telles que les 7,11-heptacosadiène (7,11ND) et le 7,11-nonacosadiène (7,11HD). La mutation de Gr39a entraîne une diminution des tentatives d'accouplement avec les femelles (Bray & Amrein 2003). De plus, Gr68a est exprimé dans le neurone mécano-sensoriel, utile au comportement de cour en complexe avec d'autres GR (Koganezawa *et al.*, 2010). Les récepteurs gustatifs Gr32a, Gr33a et Gr66a sont impliqués dans la détection de la phéromone sexuelle mâle (7-tricosène) (Lacaille *et al.*, 2007), la mutation de ces récepteurs entraînent cette fois-ci une augmentation des tentatives d'accouplement mâle-mâle (Lacaille *et al.*, 2007, Moon *et al.*, 2009). Récemment, plusieurs gènes (*ppk23* et *ppk29*) appartenant à la famille des gènes pickpocket ont été identifiés et impliqués dans le comportement de cour du mâle constituant ainsi une nouvelle classe de récepteurs aux phéromones (Thistle *et al.*, 2012, Toda *et al.*, 2012).

D'autre part, de la même manière que le labellum, les sensilles gustatives portées par les pattes abritent 4 types de cellules répondant respectivement aux molécules sucrées, aversives, à l'eau et aux faibles concentrations de sel. L'étude menée par Meunier et ses collaborateurs (2003) a mis en évidence que certaines sensilles des pattes répondent à des molécules aversives et d'autres non. De plus, il a également été montré que toutes les sensilles sensibles aux molécules aversives ne sont pas excitées par les mêmes substances (Meunier *et al.*, 2003).

Récemment, Ling et ses collaborateurs (2014) ont établi une cartographie fonctionnelle et moléculaire des sensilles localisées au niveau des 5 tarsi des pattes prothoraciques de la femelle drosophile. En effet, cette équipe a utilisé la même stratégie que celle de l'équipe Weiss et ses collaborateurs (2011) pour l'étude du labellum.

Tout d'abord, ils ont localisé et cartographié la position de chaque sensille au niveau des 5 segments du tarse des pattes prothoraciques. Sur cette première paire de pattes, ils ont dénombré 28 sensilles dont 13 organisées de manière asymétrique, seules les sensilles f1b* et f4c* ne suivent pas cette règle (**Figure 7**).

Ils ont ensuite mesuré la réponse électrophysiologique des neurones abrités par chaque sensille envers 40 composés (principalement des molécules sucrées et aversives), permettant de regrouper les sensilles en 6 groupes.

On distingue (i) les sensilles de type A1 qui répondent largement à toutes les familles de molécules testées, (ii) les sensilles de type A2 qui répondent aux molécules sucrées et à un faible nombre de molécules aversives testées (9 sur 27). (iii) Les sensilles de type B qui répondent exclusivement aux molécules sucrées et (iv) le type C qui ne répond à aucune molécule testée.

Les sensilles (v) f4c et (vi) f5v constituent deux groupes supplémentaires. En effet, la sensille f4c* pourrait s'apparenter aux sensilles de type A1, cependant, la sensille f4c* répond à très peu de molécules sucrées et à certaines molécules aversives. Par exemple, les sensilles de type A1 sont, entre autres, stimulées par la quinine et la berbérine alors que la sensille f4c* n'est stimulée que par la quinine. La sensille f5v ne répond qu'aux sucres et plus intensément que les sensilles de types A1 et A2.

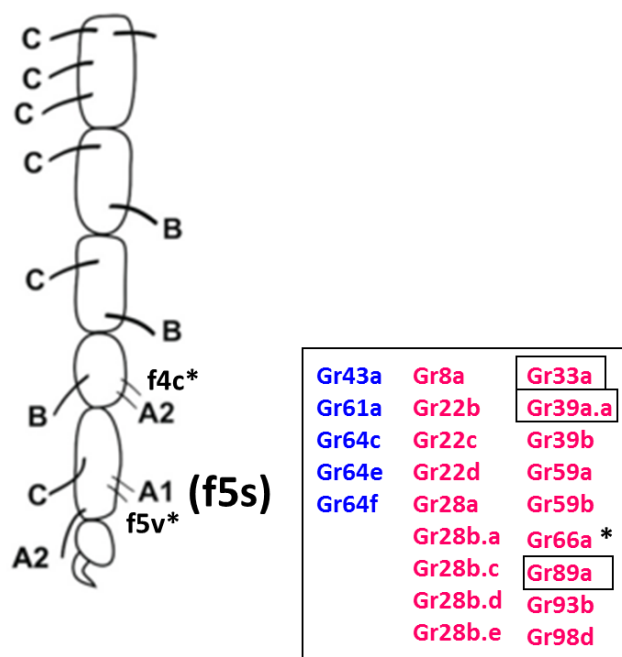


Figure 7: Cartographie fonctionnelle des sensilles des pattes prothoraciques de la femelle drosophile.

Les sensilles des pattes prothoraciques sont organisées en 6 groupes: A1, A2, B, C et les sensilles f4c* et f5v* avec différents profils de réponse vis-à-vis des molécules testées.

La sensille f5s (A1) est sensible à la caféine. Elle abrite plusieurs récepteurs, exprimant le récepteur gustatif Gr66a et 17 autres récepteurs sensibles aux molécules aversives ainsi que 5 récepteurs sensibles aux sucres.

Les récepteurs encadrés sont présents sur chaque neurone sensible aux molécules aversives suggérant la formation d'un éventuel co-récepteur indispensable à la transduction du signal aversif. Modifié à partir de (Ling *et al.*, 2014).

Ensuite, ils ont réalisé une cartographie moléculaire des récepteurs gustatifs exprimés dans les sensilles des pattes prothoraciques. Parmi l'ensemble de 68 récepteurs gustatifs identifiés chez la drosophile, 27 GR sont exprimés dans les pattes et 14 GR sont spécifiques des pattes prothoraciques. Il est intéressant de noter que la sensille f5s localisée dans la partie du tarse la plus distale est la seule qui réponde à la caféine et qui exprime Gr66a (**Figure 7**).

Le neurone à l'amer portant Gr66a co-exprime également 17 autres GR sensibles aux molécules aversives. Tout comme Weiss et ses collaborateurs (2011), ils ont mis en évidence que dans chaque sensille portant un neurone sensible aux molécules aversives, on retrouve les GR suivants: Gr33a, Gr39a.a et Gr89a suggérant la formation d'un éventuel co-récepteur « core bitter sensing » dans les pattes mais différent de celui formé dans le labellum (Ling *et al.*, 2014).

D'autre part, une étude comportementale de PER (Proboscis Extension Response) qui visait à étudier la capacité des drosophiles à discriminer des molécules aversives, a montré que les drosophiles adultes peuvent discriminer plusieurs composés aversifs selon leur concentration mais pas selon leur identité chimique (Masek & Scott 2010).

4.2- Les récepteurs gustatifs dans l'antenne

Suite à l'analyse de leur séquence, les récepteurs Gr21a et Gr63a ont été répertoriés comme récepteurs gustatifs, alors qu'ils sont exprimés dans les neurones olfactifs (ORN) du 3^{ème} segment antennaire. Ces récepteurs sont recrutés et suffisants pour la détection du gaz carbonique CO₂(Fischler *et al.*, 2007). De plus, les axones des neurones exprimant Gr21a et Gr63a se projettent dans un glomérule du lobe antennaire, comme c'est la règle pour les neurones portant les récepteurs olfactifs (ORN) et non au niveau du SOG comme le feraient les neurones portant les récepteurs gustatifs (GRN).

5- Détection de stimuli internes par les récepteurs gustatifs

Le récepteur au fructose s'exprime également dans des neurones non liés à la gustation au niveau du cerveau. Gr43a permet de détecter un niveau faible de fructose dans l'hémolymphe après la prise alimentaire. Il s'agit d'un meilleur indicateur de prise alimentaire que le sucrose ou le glucose. En effet, il est présent à de faibles quantités dans l'hémolymphe pendant la période de jeûne et augmente après la prise alimentaire. Les GR ont également un rôle dans la détection des modifications de l'état physiologique de l'animal (Miyamoto & Amrein 2013).

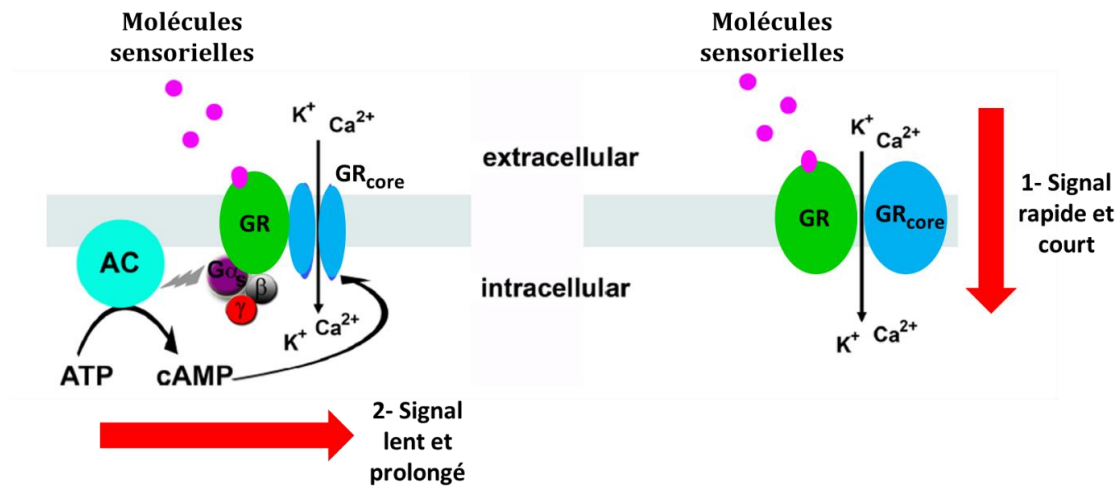


Figure 8: Schéma hypothétique de la transduction du signal au niveau des récepteurs gustatifs chez *Drosophila melanogaster*.

Les récepteurs gustatifs partagent une grande homologie avec les récepteurs olfactifs, il est possible d'imaginer qu'ils partagent également le même mécanisme de transduction du signal. Par exemple, les récepteurs gustatifs, intervenant dans la détection des molécules aversives, seraient capables de former un canal ionique dimérique avec un co-récepteur composés de 5 GR (Gr66a, Gr32a, Gr33a, Gr89a et Gr39a.a) appelés «Core-bitter GR» comme le font les récepteurs olfactifs avec Or83b. Cela provoquerait la dépolarisation du signal sans l'intervention d'une protéine G, afin d'induire un signal court et rapide. Toutefois, plusieurs études ont démontré le rôle de certaines protéines G dans la transduction du signal de plusieurs molécules sensorielles, à l'origine d'un signal tardif, lent et prolongé entraînant l'ouverture d'un canal ionique. Modifié à partir de (Ha & Smith 2009).

6- Détection de stimuli non gustatifs par les récepteurs gustatifs

Certains récepteurs gustatifs peuvent être responsables de la détection de molécules non-gustatives du fait de leur localisation neuro-anatomique. Par exemple, Gr28b.d est exprimé dans 3 neurones au niveau de l'arista de l'antenne qui permet aux drosophiles de détecter et de prévenir les rapides hausses de température ($>26^{\circ}\text{C}$) (Montell 2013). De plus, Gr28b.c est exprimé aussi au niveau des neurones de l'organe de Johnston (JO) décrit comme « l'oreille » (organe auditif) de la drosophile. Son rôle semble être lié à la détection des mouvements vibratoires (Kamikouchi *et al.*, 2009).

7- Transduction du signal

Il a été établi que les récepteurs olfactifs et gustatifs des insectes étaient des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à une protéine G hétérodimérique, qui impliqueraient un mode de transduction du signal similaire à celui des récepteurs chimiosensoriels des vertébrés. Il semblerait que ce mécanisme ne puisse pas s'effectuer du fait que les domaines d'ancrage de la protéine soient inversés par rapport au plan de la membrane. De nombreuses études ont mis en lumière la possibilité que les récepteurs gustatifs forment des récepteurs ionotropiques comme c'est le cas pour les récepteurs olfactifs (OR/Or83b) (**Figure 8**) (Benton *et al.*, 2006, Ha & Smith 2009, Sato *et al.*, 2011).

Toutefois, plusieurs études ont fait état d'un recrutement des protéines G, telles que $G_{0\alpha}$, $G_{s\alpha}$, $G_{q\alpha}$ et G_{γ} , permettant la transduction du signal de certaines molécules sucrées (Bredendiek *et al.*, 2011, Ishimoto *et al.*, 2005, Kain *et al.*, 2010, Ueno *et al.*, 2006). De plus, la détection de certaines molécules aversives nécessite également l'activation de protéines G. Par exemple, la protéine G AC78C (Ueno & Kidokoro 2008) et la guanylyl cyclase Gyc-89Da (Vermehren-Schmaedick *et al.*, 2011) participent à la détection de la caféine et le gène *norpA* code une phospholipase C, essentielle à l'activation du canal TRPA1 pour la détection de l'acide aristolochique. De même, la détection de l'acide aminé L-canavanine fait intervenir la protéine $G_{0\alpha47A}$ (Devambez *et al.*, 2013).

La transduction du signal des récepteurs gustatifs de type GR, IR ou TRP par des molécules sensorielles (sucres, molécules aversives, acides aminés, sel, acides...) s'effectue tout d'abord par l'activation de canaux ionotropiques mais également par la voie de signalisation couplée aux protéines G (**Figure 8**) (Sato *et al.*, 2011).

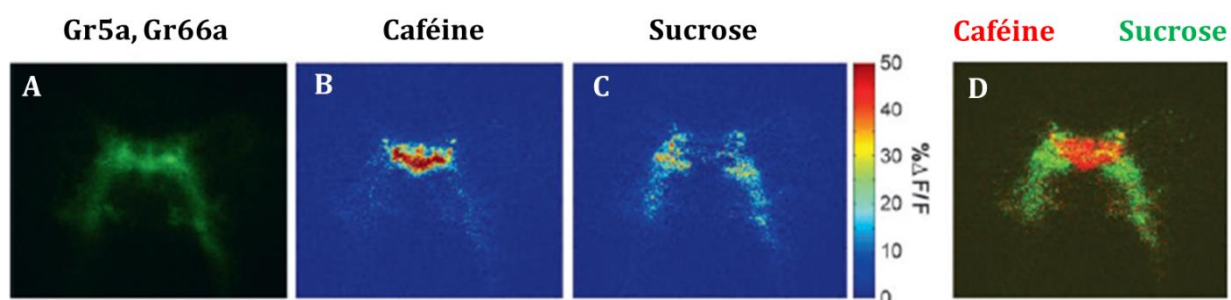


Figure 9: Carte d'activité des récepteurs gustatifs Gr5a et Gr66a dans le ganglion sous-œsophagien (SOG).

L'activité des neurones a été mesurée par imagerie calcique en utilisant une sonde calmoduline couplée à la GFP (G-CaMP). Après l'excitation du récepteur gustatif par le stimulus sensoriel, la dépolarisation de la membrane du neurone entraîne une sortie de Ca^{2+} . La Ca^{2+} libéré se fixe sur la sonde G-CaMP et va émettre un signal fluorescent. Plus la concentration extracellulaire en Ca^{2+} est importante, plus le signal fluorescent est intense. (A)- Projections neuronales et activité basale des récepteurs gustatifs Gr5a et Gr66a dans le SOG. (B & C)- Augmentation de l'intensité de fluorescence ($\Delta F/F\%$) après un traitement avec 100 mM de caféine (B) et 1 M de sucrose (C). (D)- Superposition des profils d'expression et de l'activité des récepteurs Gr66a (rouge) et Gr5a (vert). Modifié à partir de (Marella et al., 2006, Vosshall & Stocker 2007).

Ce mécanisme d'activation à double voie est aussi retrouvé chez d'autres insectes tels que le papillon *Manduca sexta* (Glendinning *et al.*, 2002). Les canaux ioniques permettent à l'individu de mettre en place un mécanisme de détection court et rapide et la voie de signalisation couplée aux protéines G permet d'avoir un signal plus large et d'amplifier le signal pour les stimuli de faible concentration en évitant ainsi les phénomènes d'adaptation. Ces deux systèmes de transduction du signal ne sont pas obligatoirement exclusifs d'un organisme ou même d'un type de sensille. Leur coexistence pourrait même expliquer une plus grande diversité et une plus large adaptabilité de la réponse chimiosensorielle.

8- Projection des neurones gustatifs

Les neurones des palpes labiaux et du pharynx, ainsi que la plupart de ceux des pattes, projettent leurs axones au niveau du ganglion sous-œsophagien (SOG), alors que le ganglion thoracique reçoit les projections des neurones des ailes et de quelques neurones des pattes (Stocker 1994).

De plus, les axones des neurones exprimant des récepteurs de molécules sucrées se projettent d'une façon isolatérale au niveau du SOG. Par contre, les axones de neurones exprimant des récepteurs des molécules amères se projettent dans la partie médiane du SOG ce qui a permis la mise en place d'une carte d'activité des neurones gustatifs dans le SOG (**Figure 9**). Il existe également deux types d'interneurones dans le SOG qui répondent soit aux sucres soit aux molécules amères et qui contrôlent respectivement le comportement d'attraction ou de répulsion. D'autres interneurones transmettent l'information aux corps pédonculés ou Mushroom Bodies (MB) en vue du guidage comportemental de l'insecte (Marella *et al.*, 2006, Vosshall & Stocker 2007).

9- Plasticité du système gustatif aversif

L'animal est capable de s'adapter aux perturbations de son environnement, ce qui va inévitablement entraîner des changements au niveau du système nerveux central (SNC). Ce phénomène d'adaptation est nommé plasticité.

Une étude récente a montré la capacité du SNC à s'adapter suite à une exposition prolongée au camphre. Le camphre est une molécule aversive mais non toxique, sa détection est contrôlée par les canaux ioniques TRP-Like dans le proboscis.

Chapitre 1: Le système gustatif

Suite à une exposition à long terme au camphre, les individus sont devenus plus tolérants à la nourriture contenant cette molécule. L'exposition au camphre a provoqué une désensibilisation des neurones exprimant les récepteurs TRP-Like. Cette désensibilisation du neurone est la résultante d'une modification post-traductionnelle du récepteur TRP-Like. Le récepteur est ubiquitinylé par l'enzyme Ube3a ce qui va recruter le protéasome et provoquer la dégradation du récepteur TRP-Like au niveau de la dendrite, entraînant ensuite l'élimination des boutons synaptiques dans les axones provoquant la désensibilisation du neurone au niveau du SOG.

Lorsque les individus sont à nouveau élevés sur un milieu d'élevage standard sans camphre sur le long terme, il en résulte une restauration du niveau protéique du récepteur TRP-Like, des boutons synaptiques et du comportement de répulsion des individus (Zhang *et al.*, 2013b).

Les récepteurs du goût ayant été tout d'abord découverts chez les mammifères, il semblait logique de penser qu'ils partageraient de nombreuses similitudes avec ceux des insectes, or cela n'est pas le cas. Les GR ne sont pas uniquement des récepteurs couplés à une protéine G mais sont, pour la plupart, des canaux ioniques. Ces canaux permettent à l'individu d'avoir un mécanisme de détection plus rapide et les voies de signalisation couplées aux protéines G permettent d'amplifier le signal pour les stimuli de faible concentration évitant ainsi les phénomènes d'adaptation. Différents types de récepteurs/canaux capables de détecter des stimuli sensoriels ont été identifiés (les GR, IR et TRP) et diverses études ont montré qu'ils ne sont pas restreints aux organes gustatifs (proboscis, pattes, marge des ailes et organe ovipositeur) ni aux stimuli gustatifs. En effet, ils sont également exprimés dans de nombreuses cellules dans l'ensemble du corps (antennes, intestins, cerveau) et dans plusieurs cas, ils sont impliqués dans la détection des changements de l'environnement (olfaction, humidité et température).

De nombreuses pistes restent encore à explorer, tels que la découverte et le mode d'action des récepteurs à l'acide, aux sels et aux acides gras mais également les modalités de perception de la texture des aliments et les mécanismes de plasticité du système nerveux périphérique suite à une perturbation de l'environnement.

Chapitre 2: Enzymes du métabolisme des xénobiotiques

2- Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

2.1- Généralités

Les êtres vivants sont quotidiennement exposés dans leur environnement à une multitude de composés naturels ou de synthèse (xénobiotiques) qui peuvent se révéler toxiques pour l'organisme. Le nom de xénobiotique (du grec ξενος 'étranger' et βιος 'vie') est donné à toute substance étrangère à un organisme et n'ayant pas de fonction physiologique vitale. La nature des xénobiotiques est extrêmement variée et peut prendre différentes formes telles que des polluants environnementaux, des additifs contenus dans la nourriture et des médicaments (Guengerich 2003).

Les xénobiotiques peuvent pénétrer dans l'organisme par différentes voies: orale, respiratoire et cutanée et vont être dégradés dans les organes de biotransformation et d'excrétion (foie, reins chez les vertébrés et corps gras et tube de Malpighi chez les invertébrés). L'absorption va dépendre du caractère lipophile de la molécule et de son degré d'ionisation qui varie selon le pH.

L'accumulation des déchets et des xénobiotiques peut avoir des effets délétères sur l'organisme compte tenu de leur potentielle toxicité. Afin de limiter ces effets, les organismes vivants disposent de plusieurs moyens de protection: (1) Les barrières naturelles comme la peau, les intestins ou les poumons peuvent empêcher l'absorption des xénobiotiques. (2) L'organisme dispose d'un arsenal d'enzymes de biotransformation qui peuvent dégrader les molécules ou changer leurs propriétés physico-chimiques afin de faciliter leur élimination *via* diverses voies comme les fèces, l'urine, la bile, la salive, l'air exhalé ou la sueur.

L'organisme a mis en place un réseau de détoxification des xénobiotiques afin de désactiver et d'éliminer les molécules hors des cellules puis hors de l'organisme. Les EMX sont organisées en réseau d'enzymes aux substrats chevauchants capables de biotransformer les molécules toxiques lipophiles en molécules hydrophiles moins réactives. La nature lipophile des xénobiotiques les empêche d'être spontanément éliminés hors de l'organisme par les fluides biologiques. Au contraire, cette caractéristique lipophile leur permet le transport et l'absorption dans la membrane pouvant induire des effets délétères sur l'organisme.

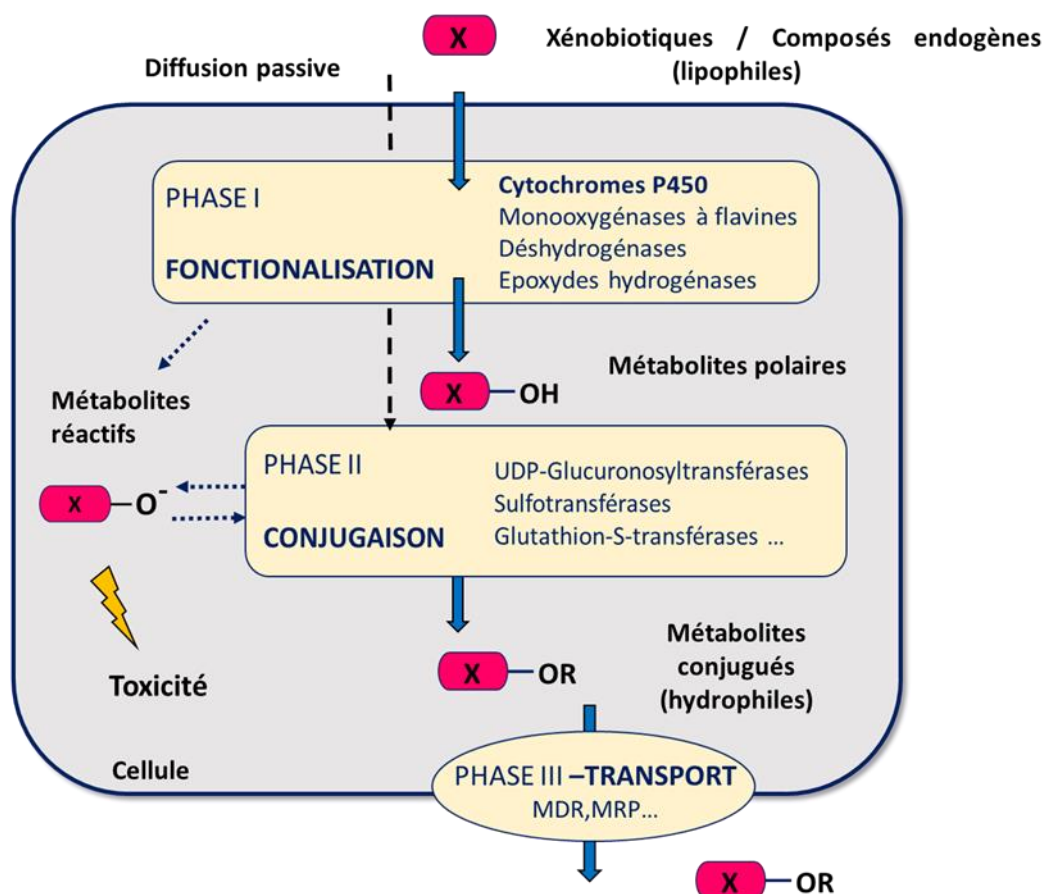


Figure 10: Schéma général des 3 phases du métabolisme des xénobiotiques.

Les EMX sont organisées en réseau d'enzymes aux substrats chevauchants capables de biotransformer les molécules toxiques lipophiles en molécules hydrophiles moins réactives au cours des phases I et II respectivement dites de Fonctionnalisation et de Conjugaison. Les métabolites conjugués hydrophiles sont par la suite plus facilement excrétés par des transporteurs de phase III, avant d'être éliminés hors de l'organisme.

X : Molécules lipophiles ; $X-OH$: Métabolites hydroxylés ; $X-OR$: Métabolites conjugués

Après leur biotransformation, les xénobiotiques vont être plus facilement excrétés par des transporteurs avant d'être éliminés *via* les fluides biologiques. Les EMX sont relativement bien conservées au cours de l'évolution et se retrouvent chez les bactéries, les plantes, les insectes et chez les vertébrés (Xu *et al.*, 2005a).

2.2- Le métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques se déroule classiquement en trois phases (**Figure 10**). Les enzymes de phase I réalisent l'étape de fonctionnalisation qui consiste à greffer un groupement fonctionnel sur le xénobiotique, principalement catalysée par les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP). Le métabolite issu de la réaction présente les propriétés nucléophiles ou électrophiles nécessaires à l'étape suivante de conjugaison.

Les enzymes de phase II prennent en charge les métabolites issus de l'étape de fonctionnalisation, ou bien des molécules possédant déjà un groupement fonctionnel hydrophile. Généralement, elles catalysent la conjugaison d'un groupement polaire qui peut être selon l'enzyme et l'organisme un acide glucuronique (UDP-glucuronosyltransférases), le glutathion (Glutathion-S-transférases) ou un groupe sulfate (Sulfotransférases). Lors de la phase III, les métabolites conjugués hydrophiles sont excrétés hors de la cellule, ce qui nécessite l'intervention de protéines membranaires appartenant à la famille des transporteurs ATP-dépendant de type MRP (Multidrug Resistance associated Proteins) (Xu *et al.*, 2005a).

2.2.1- Les enzymes de phase I ou de fonctionnalisation

Au cours de la première étape de biotransformation, les xénobiotiques sont pris en charge par les enzymes dites de fonctionnalisation. Ces enzymes catalysent l'introduction de groupements polaires de types OH, NH₂ et COOH, permettant d'augmenter la polarité des xénobiotiques et de favoriser leur élimination ou leur conjugaison par les enzymes de phase II (Guengerich 2003). Néanmoins, il est possible qu'après cette étape de fonctionnalisation, les métabolites produits soient davantage réactifs que la molécule de départ et puisse ainsi engendrer une toxicité, on parle alors de bioactivation (Nilsson *et al.*, 2000).

Les principales enzymes de phase I sont les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP) mais il existe également les monooxygénases à flavines, des déshydrogénases, des époxydes hydrolases, des réductases, des oxydases et des carboxylestérases (Oppermann & Maser 2000).

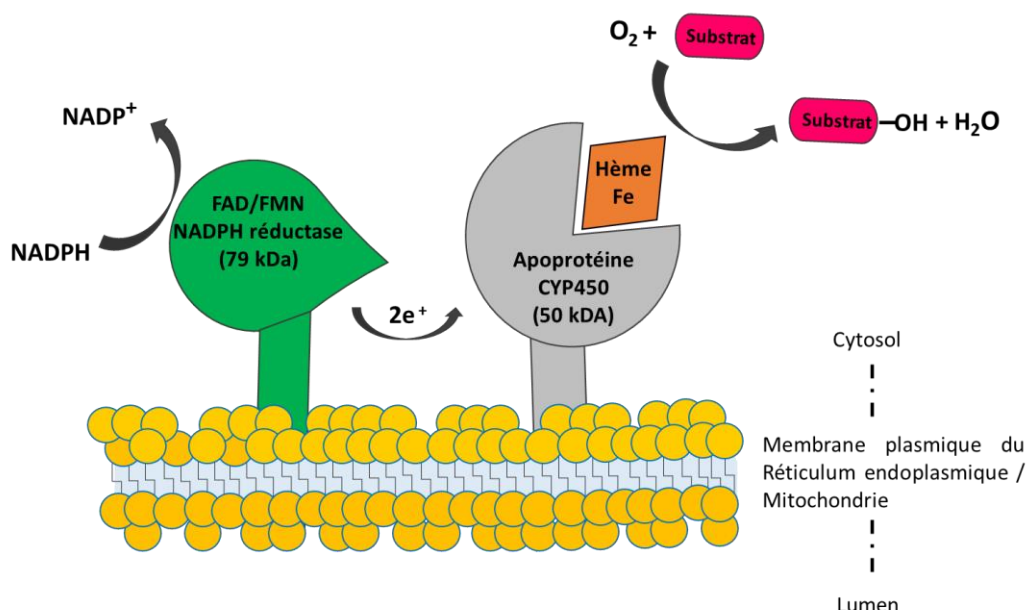


Figure 11: Mode d'action des Cytochromes P450 (CYP).

Les CYP sont des hémoprotéines qui catalysent une réaction de monooxygénation à partir du dioxygène O_2 . Un atome d'oxygène est transféré au substrat et l'autre est réduit en eau. Cette réaction d'oxydo-réduction est possible grâce au transfert d'électrons de la FAD/FMN NADPH réductase. La localisation des CYP est variée, ces protéines sont localisées au niveau de la membrane, du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie et sont également sécrétées dans le cytosol (Bock 2003, Chertemps *et al.*, 2012, Feyereisen 2006, Nagashima & Touhara 2010, Neve & Ingelman-Sundberg 2008).

Tableau 2: Classification des gènes codant les Cytochromes P450 (CYP) chez *Drosophila melanogaster*.

Chez *Drosophila melanogaster*, la superfamille des CYP est organisée en 4 clades regroupant 85 gènes et 7 pseudogènes. Les CYP sont classés en familles et sous familles selon leur degré d'homologie. Modifié à partir de (Feyereisen 2006).

Ordre	Gènes /Espèces	Clade Mitochondrial	Clade 2	Clade 3	Clade 4	Total
Diptères	<i>D. melanogaster</i>	11	6	36	32	85
	familles CYPs	CYP12, 49, 301, 302, 314, 315	CYP18, 303-307	CYP6,9,28, 308-310, 317	CYP4, 311-313, 316, 318	
	Pseudogènes	CYP49a1p	CYP307a2p	CYP6a15p, 6t2p, 6a16p, 9f3p	CYP313a1p	7

2.2.1.1- Les Cytochromes P450 (CYP)

Les CYP forment l'une des principales familles d'enzymes impliquées dans la fonctionnalisation des xénobiotiques. Cette large famille d'hémoprotéines catalyse l'oxydation d'un grand nombre de composés endogènes et exogènes.

Ces enzymes catalysent des réactions d'oxydoréduction dont la plus importante est l'hydroxylation en utilisant un cofacteur NADPH. Pour catalyser ces réactions, les CYP incorporent un atome d'oxygène dans le substrat à partir de l'oxygène moléculaire (O₂). Les réactions d'oxydoréduction nécessitent une source d'électrons apportée par la NADPH-cytochrome-réductase. Cette dernière est une flavoprotéine présente dans la membrane du réticulum endoplasmique qui assure le transfert de deux électrons du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) jusqu'au CYP (**Figure 11**).

Bien que les réactions de mono-oxygénations au niveau des carbones soit les plus fréquentes, les CYP peuvent catalyser de nombreuses autres réactions telles que des N, S ou O-oxydations (Feyereisen 1999, Guengerich 2003).

Chez les insectes, et plus particulièrement chez *Drosophila melanogaster*, la superfamille des CYP regroupe 85 gènes et 7 pseudogènes qui ont été regroupés en familles et sous familles selon leur degré d'homologie (Tijet *et al.*, 2001). En effet, la nomenclature introduite par Nebert *et al* (1987) propose que tous les membres d'une famille et d'une sous-famille partagent respectivement au moins 40 % et 55 % d'homologie de séquence en acides aminés (Nebert *et al.*, 1987).

De plus, la superfamille des CYP a été scindée en 4 clades: CYP2, CYP3, CYP4 et le clade des CYP mitochondriales dont les membres sont phylogénétiquement proches (**Tableau 2**) (Feyereisen 2006).

Chez les insectes, les CYP sont principalement connus pour leur rôle dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la résistance aux insecticides (Bhaskara *et al.*, 2008, Daborn *et al.*, 2007, Le Goff *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006). Toutefois, ils interviennent également dans des processus physiologiques essentiels à l'insecte allant du développement à la reproduction (Chung *et al.*, 2009).

2.2.1.1.1- La superfamille des CYP: le clade des CYP mitochondriaux

Chez les vertébrés, les CYP mitochondriaux sont généralement impliqués dans le métabolisme des stéroïdes et de la vitamine D. Chez les insectes, il a été montré que le clade mitochondrial regroupe 6 gènes et qu'il est divisé en deux familles.

Un premier groupe de gènes conservés est impliqué dans des fonctions physiologiques essentielles au développement de l'insecte. Par exemple, chez *Drosophila melanogaster*, plusieurs CYP participent au contrôle de la synthèse de l'hormone stéroïde de mue et de métamorphose: le 20 hydroxy-ecdysone (20H).

Les gènes *CYP302a1* (*disembodied* ; 22-hydroxylase), *CYP315a1* (*shadow* ; 2-hydroxylase) et *CYP314a1* (*shade* ; 20-hydroxylase) codent des protéines responsables des étapes successives d'hydroxylation de l'ecdysone en sa forme active le 20H (Gilbert 2004, Petryk *et al.*, 2003, Warren *et al.*, 2002).

Le second groupe de gènes semble impliquer dans le métabolisme des xénobiotiques. Par exemple chez *Drosophila melanogaster*, *CYP12a1* est inductible par le phénobarbital et il est induit de manière constante dans la lignée sélectionnée pour être résistante au phénobarbital (Daborn *et al.*, 2007).

2.2.1.1.2- La superfamille des CYP: le clade 2

Chez les insectes, le clade 2 comprend 6 gènes codant des CYP principalement impliqués dans des processus physiologiques liés au développement. Diverses études ont permis d'identifier plusieurs CYP candidats appartenant à la famille des gènes *halloween*.

Les gènes *halloween* sont des gènes architectes indispensables au développement des insectes. Par exemple, le gène *phantom* code l'enzyme CYP306A1, une 25-hydrolase, qui participe à la synthèse de l'ecdysone dans les glandes prothoraciques (Niwa *et al.*, 2004, Warren *et al.*, 2004). De plus, les gènes *spook* et *spookier* codent respectivement les hydroxylases CYP307A1 et CYP307A2 qui s'expriment au cours des premiers stades embryonnaires et sont également impliquées dans la synthèse de l'ecdysone, le précurseur de la 20H (Ono *et al.*, 2006). Enfin, une étude récente a montré que l'enzyme CYP18G1 est responsable de l'arrêt de la

métamorphose. Cette enzyme catalyse une étape d'hydroxylation qui va convertir l'hormone 20H en 20,26-dihydroxy-ecdysone (Guittard *et al.*, 2011).

Ces enzymes n'interviennent pas uniquement dans la synthèse d'hormone de développement mais également dans le développement et l'organisation des sensilles sensorielles. En effet, Willingham et Keil ont mis en évidence que le gène *nompH* codant l'enzyme CYP303A1 est indispensable pour le développement et l'organisation des sensilles mécano- et chimio-sensorielles. Ils ont démontré que le mutant *nompH* présentait un défaut de la perception sensorielle, en effet, bien que les sensilles présentent une organisation externe normale, leur structure interne est complètement désorganisée (Willingham & Keil 2004).

2.2.1.1.3- La superfamille des CYP: le clade 3

Les CYP appartenant au clade 3, et particulièrement à la famille CYP6 ont été les premiers à avoir été clonés et caractérisés chez les insectes. Ils présentent des homologies de séquences avec les familles CYP3 et CYP5 des mammifères respectivement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes ainsi que dans la synthèse de la thromboxane A2 (Feyereisen 1999, Guengerich 2003).

Ce clade contient 36 CYP chez les Diptères et il est organisé en un large cluster. Plusieurs membres de ce clade sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la résistance aux insecticides. Par exemple, les gènes codant les enzymes CYP6W1, CYP6A2, CYP6A8 et CYP6G1 sont inductibles par un large éventail de xénobiotiques tels que la caféine, la quinine, le DTT (dithiothréitol) et le phénobarbital (Berge *et al.*, 1998, Bhaskara *et al.*, 2008, Bhaskara *et al.*, 2006, Daborn *et al.*, 2002, Giraudo *et al.*, 2010, Le Goff *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006). De plus, une étude récente chez *Drosophila melanogaster* a mis en évidence un lien entre l'enzyme CYP6A20 et la perception de la phéromone agressive des mâles. Toutefois, aucune approche biochimique n'a mis en évidence le rôle de CYP6A20 dans le métabolisme de cette phéromone (Wang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, une autre étude a montré que CYP6G2 chez *Drosophila melanogaster* est exprimée dans la *corpora allata* au stade embryonnaire et larvaire. La *corpora allata* est le lieu de synthèse de l'hormone juvénile chez les insectes, ce qui suggère que CYP6G2 pourrait être impliqué dans la synthèse de l'hormone juvénile (Chung *et al.*, 2009).

Chapitre 2: Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

De plus, des travaux réalisés chez *Diploptera punctata* ont montré que le rôle de CYP15A1, exprimée dans la *corpora allata*, est de catalyser la conversion de l'acide farnésoïque en hormone juvénile sous la forme JHIII bisepoxide (JHB3) (Helvig *et al.*, 2004). Il n'y a pas de gène orthologue distinct de CYP15A1 chez la drosophile, cependant, il est établi que la JHB3 est la forme de l'hormone juvénile la plus synthétisée chez *Drosophila melanogaster*. Elle est produite par une voie de synthèse impliquant un CYP et deux réactions d'époxidation. Ces observations suggèrent que *CYP6g2* pourrait être le gène orthologue de *CYP15a1* chez *Drosophila melanogaster* (Helvig *et al.*, 2004).

2.2.1.1.4- La superfamille des CYP: le clade 4

Chez les diptères, le clade 4 regroupe 32 gènes codants des CYP regroupés en 6 familles. La famille CYP4 s'avère être inductible par les xénobiotiques et impliquée dans la résistance aux insecticides mais participerait également à d'autres processus physiologiques telles que la dégradation de phéromones et odorants, la reproduction et la synthèse des acides gras, éléments clé de la vie. Une étude a montré que CYP4AW1 exprimé spécifiquement dans l'antenne du coléoptère *Phyllopertha diversa* est capable de dégrader la phéromone sexuelle de la femelle (Maibeche-Coisne *et al.*, 2004b).

De plus, chez *Drosophila melanogaster*, d'autres études ont mis en évidence l'implication de l'enzyme CYP4D21 dans l'efficacité de la cour du mâle (Fujii *et al.*, 2008) et de CYP4G1 dans la synthèse des triacylglycérides (Gutierrez *et al.*, 2007).

La superfamille des enzymes CYP constitue un répertoire d'enzymes impliquées dans divers processus physiologiques chez les insectes tels que la synthèse et la dégradation d'hormones essentielles au développement, la synthèse des acides gras, la reproduction, la perception et dégradation d'odeurs et de phéromones sexuelles mais également dans le métabolisme des xénobiotiques et la résistance aux insecticides. Ces enzymes aux multiples facettes permettent aux insectes de s'adapter rapidement et efficacement aux multiples sources de l'environnement pouvant se révéler toxiques.

2.2.2- Les enzymes de phase II ou de conjugaison

Les réactions de phase II sont principalement catalysées par 3 familles d'enzymes: les UDP-glycosyltransférases (UGT), les glutathion-S-transférases (GST) et les sulfotransférases. A l'issue de la phase I, les enzymes de conjugaison vont greffer aux xénobiotiques des groupements endogènes encore plus polaires. Ces enzymes catalysent respectivement la greffe des groupements suivants: l'acide glucuronique et des dérivés de sucre, du glutathion et des sulfates (Iyanagi 2007). Chez les insectes, les UGT utilisent l'UDP-glucose ou l'UDP galactose comme co-substrat et pas l'acide glucuronique (Bozzolan *et al.*, 2014).

Les UGT sont les enzymes majeurs de la classe II (Bock 2003). Elles vont catalyser des réactions de conjugaison covalente et sont également impliquées dans certains processus physiologiques chez les insectes.

Par exemple, la chitine synthase est une UDP-glycosyl-transférase qui catalyse la principale protéine de l'exosquelette des insectes: la chitine (Merzendorfer 2006). D'autre part, il a été mis en évidence chez *Bombyx mori*, qu'une UGT (BmUGT35B1) est capable de lier *in vitro* un large spectre de métabolites secondaires de plantes telles que les composés phénoliques, les coumarines et divers flavonoïdes. Cette étude suggère un rôle des UGT dans la détection et la détoxification de produits allélochimiques de plantes. Ces enzymes permettraient de diminuer les effets toxiques de ces produits après leur ingestion (Huang *et al.*, 2008, Luque *et al.*, 2002).

2.2.3- Les transporteurs de phase III ou d'excrétion

De par leur nature hydrophobe, les xénobiotiques peuvent aisément traverser les différentes membranes cellulaires par diffusion passive. A l'inverse, les métabolites formés par l'action des enzymes des phases I et II sont devenus plus hydrophiles et de ce fait ne peuvent plus franchir les membranes. Afin d'éviter l'accumulation de métabolites susceptibles de perturber l'homéostasie cellulaire, les cellules disposent de systèmes d'efflux permettant l'excrétion des métabolites. Ces protéines de transport, appelées protéines de phase III, sont donc des transporteurs membranaires peu spécifiques capables de prendre en charge des molécules conjuguées.

Chapitre 2: Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

L'excrétion des métabolites hors de la cellule nécessite des transporteurs membranaires actifs. Les transporteurs de phase III sont des protéines appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) dont l'activité dépend de l'hydrolyse de l'ATP tel que le transporteur ATP-dépendant de type MRP (Multidrug Resistance Proteins) ou cMOAT (canicular Multispecific Organic Anion Transporter). Ces transporteurs doivent être capables de prendre en charge des molécules de structures différentes comme les xénobiotiques et leurs métabolites (Xu *et al.*, 2005a).

2.3- Régulation de l'expression des EMX

Il existe de grandes disparités individuelles concernant l'expression des EMX. De nombreux facteurs, tels que le polymorphisme génétique (Guengerich 2003), l'âge (Pletcher *et al.*, 2005), le sexe (Fujii *et al.*, 2008, Le Goff *et al.*, 2006), le statut nutritionnel et hormonal (Pletcher *et al.*, 2005), certaines pathologies, les médicaments (Guengerich 2003) ou l'exposition à des facteurs environnementaux peuvent moduler l'expression des EMX (Bhaskara *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006). Il existe également une variation de l'expression de certaines EMX en fonction des rythmes circadiens (Fujii *et al.*, 2008).

Par exemple, certains CYP impliqués dans le développement de l'insecte sont exprimés dès les premiers stades embryonnaires alors que d'autres enzymes sont exprimées plus tardivement (Chung *et al.*, 2009).

Chez les vertébrés ainsi que chez les invertébrés, certaines enzymes sont exprimées de façon constitutive dans certains tissus, d'autres sont soumises à des mécanismes de régulation (Bhaskara *et al.*, 2006, Maitra *et al.*, 2000, Misra *et al.*, 2011, Morra *et al.*, 2010, Thiebaud *et al.*, 2010). En effet, l'expression et l'activité des EMX peut être modulée par ses substrats (Xu *et al.*, 2005a), permettant une réponse adaptative face à un changement environnemental. Le fonctionnement coordonné du réseau de détoxification constitué par les différentes familles d'EMX dépend en partie de leur régulation par les récepteurs nucléaires de la superfamille des hormones stéroïdes.

Tout comme les EMX, les récepteurs nucléaires peuvent lier à la fois des ligands endogènes et des xénobiotiques. Après liaison du ligand, les récepteurs nucléaires agissent comme des facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes.

Chez les vertébrés, plusieurs récepteurs nucléaires et facteurs de transcription modulant l'expression d'EMX ont été identifiés tels que AhR (Aryl-hydrocarbon Receptor), CAR (Constitutive Androstane Receptor), PXR (Pregnane X Receptor) (Maglich *et al.*, 2002) et Nrf2 (F-E2-related factor 2) (Nguyen *et al.*, 2009).

Par contre, très peu de choses sont connues sur la régulation de l'expression des EMX chez les insectes car les recherches se sont tout d'abord focalisées sur la réponse adaptative des individus suite à une exposition à divers insecticides. En d'autres termes, comment des individus peuvent développer une résistance envers un xénobiotique. Par exemple, la surexpression de *CYP6g1* permet de conférer une résistance au DTT (Daborn *et al.*, 2002).

Toutefois, une étude récente chez *Drosophila melanogaster* a démontré que le facteur de transcription cap 'n' collar isoforme C (CncC), gène orthologue de *Nrf2* chez l'homme, est essentielle à l'induction transcriptionnelle de plusieurs EMX (*CYP6a2*, *CYP6a8*, *GSTd2* et *GSTd7*) en réponse au phénobarbital (Misra *et al.*, 2011). De plus, ils ont montré qu'en présence de phénobarbital, le complexe inactif CncC/Keap1, situé dans le cytoplasme se dissocie et le facteur de transcription CncC migre dans le noyau pour se lier à la protéine Maf. Ensuite, l'hétérodimère CncC/Maf se fixe sur un élément de réponse de 15 paires de base dans la région promotrice de *CYP6a2* pour induire la transcription des gènes EMX cibles en réponse au phénobarbital (Misra *et al.*, 2011).

2.4- Expression et localisation

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont présentes à travers tout le règne vivant et peuvent prendre en charge un large spectre de substrats. Elles peuvent avoir une expression tissulaire et cellulaire très variée.

2.4.1- Localisation tissulaire

On a longtemps pensé que les EMX étaient spécifiquement ou préférentiellement exprimés dans les organes de biotransformation comme le foie, les reins chez les vertébrés ou le corps gras et les tubes de Malpighi chez les insectes (Chung *et al.*, 2009, Giraud *et al.*, 2010).

Chapitre 2: Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Toutefois, d'autres tissus, qui ne sont pas considérés comme de organes de biotransformation majeurs, mais qui sont néanmoins en contact avec les xénobiotiques, expriment aussi des EMX telle que la muqueuse olfactive chez les vertébrés (Heydel *et al.*, 2013, Thiebaud *et al.*, 2013).

Chez les insectes, les intestins (Chung *et al.*, 2009), le cerveau (Yang *et al.*, 2007) et les antennes (Wang *et al.*, 1999) sont riches en EMX et agissent en tant que barrières naturelles et toxicologiques. De plus, l'ensemble des cellules (neurones et cellules accessoires) localisées dans les sensilles sensorielles sont en contact permanent avec les xénobiotiques, la présence d'EMX à ce niveau permet une protection efficace (Chertemps *et al.*, 2012, Maibeche-Coisne *et al.*, 2004b, Wojtasek & Leal 1999).

2.4.2- Expression cellulaire

Parmi les EMX, les CYP sont pour la plupart localisés au niveau de la membrane des mitochondries (Feyereisen 2006) alors que les UGT sont majoritairement localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Bock 2003). De plus, certaines enzymes, comme les carboxylestérases, peuvent être également sécrétées dans la lymphe sensillaire chez les insectes (Chertemps *et al.*, 2012, Maibeche-Coisne *et al.*, 2004a) et dans le mucus olfactif chez les vertébrés (Nagashima & Touhara 2010), ce qui s'avère être une place de choix pour une action directe avec les stimuli sensoriels. Ces différentes localisations renforcent la capacité des EMX à métaboliser un grand nombre d'EMX à l'échelle du tissu et de la cellule.

Chapitre 3: Evènements péri-récepteurs: molécules chimiosensorielles et enzymes du métabolisme des xénobiotiques

3- Les évènements péri-récepteurs

Les évènements péri-récepteurs comprennent l'ensemble des protéines autres que les récepteurs capables d'interagir avec les molécules sensorielles (xénobiotiques) et dont la localisation et la fonction sont compatibles avec une modulation de la détection (Heydel *et al.*, 2013). Ces processus permettent l'entrée, la sortie, le transport ou la modification de la demi-vie des molécules sensorielles dans l'environnement des récepteurs (Getchell *et al.*, 1984). L'environnement direct des récepteurs comprend la lymphe sensillaire mais également le cytoplasme des neurones et des cellules accessoires dans lequel les xénobiotiques peuvent pénétrer compte tenu de leur caractère souvent lipophile.

3.1- Les protéines de transport: odorant binding proteins (OBP)

Les molécules sensorielles ainsi que les phéromones doivent traverser la lymphe sensillaire hydrophile, composée de 98 % d'eau et de 2 % de protéines et polysaccharides, pour atteindre les récepteurs chimiosensoriels. Le caractère hydrophobe des molécules sensorielles laisse supposer l'existence de transporteurs facilitant l'accès de ces molécules peu solubles aux récepteurs chimiosensoriels (Heydel *et al.*, 2013, Pelosi 1996, Steinbrecht 1998).

En 1981, Vogt et Riddiford isolent dans l'antenne du papillon mâle *Antheraea polyphemus* deux familles de protéines. La première, appelée pheromone-binding protein (PBP), capable de lier la phéromone sexuelle de la femelle (Vogt & Riddiford 1981, Zhou 2010) tandis que la seconde famille appartient à la classe des estérases aussi appelée odorant degrading enzymes (ODE) dont la fonction est de dégrader la phéromone sexuelle.

Parallèlement, Pelosi et ses collaborateurs ont isolé une protéine liant le 2-isobutyl-3-méthoxy-pyrazine chez la vache (Pelosi 1994). La présence généralisée de telles protéines, à la fois chez les vertébrés et les invertébrés implique qu'elles ont un rôle important dans le processus de l'olfaction.

Chapitre 3: Les évènements péri-récepteurs

Chez les insectes, les OBP appartiennent à une famille multigénique qui est organisée en clusters, il existe une faible homologie de séquence entre les OBP et les PBP d'une même espèce. Par exemple, parmi les 49 OBP circulantes chez *Drosophila melanogaster*, il n'y a que 10 à 15 % d'homologie de séquence entre ces OBP.

Les OBP sont de petites protéines solubles que l'on trouve en grande concentration dans la lymphe sensillaire (de l'ordre du millimolaire) et sont sécrétées dans la lymphe sensillaire par les cellules accessoires portées par les sensilles olfactives. Deux classes d'OBP ont été identifiées: (1) la classe des OBP liant spécifiquement les phéromones appelée PBP (Pheromone-Binding Protein) et (2) les OBP liant un large spectre de molécules sont appelées general-OBP (gOBP) (Heydel *et al.*, 2013, Pelosi *et al.*, 2006).

La localisation des OBP n'est pas restreinte à un type de sensilles olfactives. En effet, les OBP LUSH (OBP76A), PBPR5 (OBP28A) et PBPR2 (OBP19D) sont respectivement exprimées dans les sensilles olfactives de type trichoïdes, basiconiques et coeloniques. Toutefois, l'OBP19D est aussi exprimée au niveau des sensilles gustatives du labellum, des pattes et des ailes suggérant l'implication des OBP dans la détection des molécules gustatives (Shanbhag *et al.*, 2001a).

Malgré la grande diversité de séquences primaires des OBP chez les insectes, elles partagent plusieurs caractéristiques biochimiques: (1) une séquence protéique d'environ 150 acides-aminés et un poids moléculaire compris entre 15 et 20 kDa ; (2) un point isoélectrique acide (entre 4 et 6) ; (Hetzler *et al.*,) une possibilité d'oligomérisation ; (4) la présence de 6 cystéines et de trois ponts disulfures de topologie conservée ; (5) un profil d'hydrophobicité conservé ; et (6) une structure secondaire composée de 6 hélices α (Zhou 2010).

Une seconde famille de protéines de transport a été identifiée: les CSP (chemosensory proteins). Ce sont de petites protéines également présentes dans la lymphe sensillaire exprimant 4 cystéines conservées et capables de former des liaisons avec des odorants. Leur affinité pour les odorants est moins grande que pour les OBP et leur rôle n'est pas clairement établi dans la perception du signal (Jacquin-Joly *et al.*, 2001, Sanchez-Gracia *et al.*, 2009). Les CSP pourraient éviter la perte des molécules sensorielles au niveau de la membrane des neurones (Vogt 2003).

Chez les insectes, les rôles des OBP a été démontré de manière fonctionnelle dans la perception olfactive et phéromonale (Ha & Smith 2006, Harada *et al.*, 2008, Xu 2005) mais également dans la perception gustative (Galindo & Smith 2001, Matsuo 2007, Swarup *et al.*, 2014). Toutefois, leurs mécanismes d'action restent encore incertains.

Ils sembleraient que les OBP soient impliquées dans la discrimination, la solubilisation des molécules odorantes, leur protection contre les ODE, notamment les estérases également présentes dans la lymphe sensillaire, ainsi que leur transport jusqu'aux récepteurs chimiosensoriels et l'activation de ces derniers (Heydel *et al.*, 2013, Pelosi *et al.*, 2006, Steinbrecht 1998).

Concernant le rôle des OBP dans l'activation des récepteurs chimiosensoriels, la protéine LUSH est un bon exemple. Cette protéine a été identifiée chez la drosophile comme une PBP chargée de capter la phéromone cis-vacényl acétate (cVA) et une mutation de *LUSH* entraîne une perte de la réponse comportementale et électrophysiologique des neurones dans l'antenne (Xu *et al.*, 2005b).

De plus, il a été montré que la mutation d'un acide aminé au niveau du site actif, provoque un changement de conformation tridimensionnelle de la protéine qui a lieu normalement suite à la fixation du ligand et active le récepteur Or67d. Le changement de conformation de la protéine en complexe avec le ligand semble indispensable à l'activation du récepteur (Laughlin *et al.*, 2008).

Toutefois, ces derniers résultats semblent controversés. En effet, Gomez *et al* (2013) ont démontré que ce même mutant de *LUSH* est incapable d'activer le récepteur Or67d *in vivo*, remettant ainsi en cause l'implication d'un changement de conformation protéique pour activer le récepteur. De plus, ils ont également montré qu'Or67d pouvait être activé par de forte concentration de cVA sans l'intervention de la protéine LUSH. Ainsi, il semblerait que LUSH intervienne mais qu'elle ne soit pas essentielle à la détection phéromonale suggérant une activation directe du récepteur par le ligand (Gomez-Diaz *et al.*, 2013).

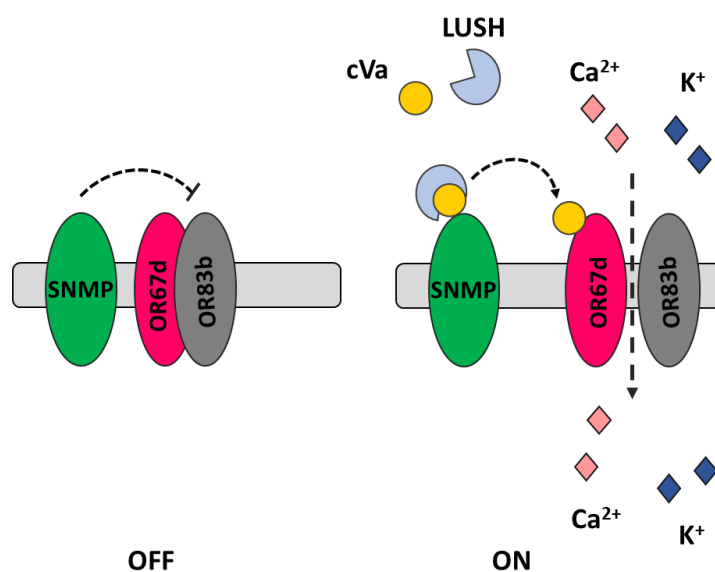


Figure 12: Mécanisme d'action proposé pour la détection de la phéromone cis-vacényle acétate par les SNMP.

L'OBP extracellulaire LUSH reconnaît et prend en charge la phéromone d'intérêt: le cis-vacényle acétate (cVa) pour le transférer sur la protéine membranaire SNMP. En complexe avec le cVa, la protéine SNMP lève l'inhibition du complexe de récepteurs ionotropiques Or67d et Or83b et leur transfère le cVa, ce qui entraîne la transduction du signal.

Une dernière famille de protéines a été identifiée dans l'espace péri-récepteur: les sensory neuro membrane protein (SNMP). Ces dernières sont exprimées au niveau de la membrane des neurones et jouent un rôle dans la séparation du ligand du complexe OBP / ligand et / ou dans le transfert de ce dernier sur le récepteur chimiosensoriel Or67d (Gomez-Diaz *et al.*, 2013, Ha & Smith 2009). La protéine SNMP est une protéine homologue du récepteur CD36 chez les mammifères, impliquée dans le transport de lipides à travers la membrane (Benton *et al.*, 2007). Chez la drosophile, la protéine SNMP est exprimée au niveau des sensilles trichoïdes des antennes, reconnaît le complexe LUSH/cVA et transfère le cVA au récepteur Or67d qui s'exprime en hétérodimère avec Or83b pour induire la transduction du signal (Ha & Smith 2006, 2009). Les mécanismes ne sont pas clairement établis mais il semblerait que la protéine SNMP joue aussi un rôle dans l'arrêt du signal sensoriel en inhibant le récepteur après sa liaison avec son ligand (Jin *et al.*, 2008) (**Figure 12**).

Les OBP semblent également être impliquées dans la perception des molécules gustatives. En effet, plusieurs OBP ont été identifiées dans les organes gustatifs, certaines protéines sont spécifiquement exprimées dans les sensilles gustatives des pattes (Galindo & Smith 2001). Plusieurs études ont montré l'implication d'OBP dans la détection des stimuli gustatifs. Par exemple, les OBP57d et OBP57e, localisées dans les sensilles gustatives des pattes, détectent les acides hexanoïques et octanoïques sécrétés par le fruit de l'arbuste *Morinda citrifolia*. Ces études ont permis de mettre en avant le rôle des OBP dans la sélection des sites d'oviposition de *Drosophila sechellia* (Harada *et al.*, 2008).

De plus, chez *Drosophila melanogaster*, Swarup *et al* (2014) ont montré que la diminution de l'expression de l'*OBP28a* (par ARN interférence) provoque une augmentation de la consommation (méthodologie MultiCAFE) d'un mélange quinine/saccharose de 188 % contrairement aux individus contrôle suggérant que cette OBP serait impliquée dans le transport des molécules aversives. Par opposition, dans cette même étude, la diminution de l'expression de l'*OBP56h* a entraîné une réduction et une inhibition de la consommation du mélange quinine/sucrose suggérant que cette OBP serait impliquée dans la séquestration et la clairance des molécules aversives (Swarup *et al.*, 2014). Cette étude a également montré un dimorphisme sexuel de l'expression des OBP et une possible combinaison entre OBP pour détecter un large spectre de molécules sensorielles.

Chapitre 3: Les évènements péri-récepteurs

Un autre exemple de l'implication d'une OBP dans le transport de molécules aversives est l'inhibition de l'activité d'un récepteur chimiosensoriel. Chez *Drosophila melanogaster*, il a récemment été montré que l'OBP49a est capable de transporter des molécules aversives en mélange avec des molécules sucrées et d'inhiber la réponse des récepteurs aux sucres tout en activant les récepteurs aux molécules aversives ayant pour conséquence une inhibition de la consommation (Jeong *et al.*, 2013).

L'ensemble des études s'accorde pour dire que les OBP agissent comme un filtre avant l'activation des récepteurs. Elles solubilisent les molécules hydrophobes pour faciliter leur accès aux récepteurs en formant un complexe OBP/molécules chimiosensorielles qui pourra interagir avec le récepteur et ainsi participer à l'activation et / ou à l'arrêt du signal (Heydel *et al.*, 2013).

3.2- Les enzymes de dégradation: odorant degrading enzymes (ODE)

En vue d'expliquer l'inactivation du signal sensoriel, parallèlement à l'inactivation transductionnelle des récepteurs, plusieurs hypothèses ont été avancées telles que l'internalisation des récepteurs, l'intervention des SNMP, la séquestration des odeurs par les OBP ou bien la dégradation enzymatique des substrats par les Odorant degrading enzymes (ODE).

Les ODE sont capables de capter et dégrader les molécules sensorielles présentes dans les tissus olfactifs et gustatifs. Ces enzymes sont caractérisées par leur spécificité d'action sur un groupement fonctionnel. Elles peuvent avoir des localisations cellulaires variées (intracellulaires, membranaires, extracellulaires [sécrétée dans la lymphe sensillaire]), et peuvent appartenir à différentes familles d'enzymes telles que les carboxylestérases, les aldéhyde-oxydases/déshydrogénases, les alcools déshydrogénases, les époxydes hydrolases, et les enzymes métabolisme des xénobiotiques (CYP, GST et UGT) (Heydel *et al.*, 2013). Il est aujourd'hui bien établi que la perception chimiosensorielle est initiée par la liaison d'une molécule sensorielle à un (des) récepteur(s) chimiosensoriel(s) (Nebert *et al.*, 1987). Un tel mécanisme implique que les molécules sensorielles présentes dans l'environnement des récepteurs doivent être rapidement inactivées et / ou éliminées pour éviter une stimulation prolongée et une saturation du système (Heydel *et al.*, 2013).

3.2.1- Les ODE peuvent être exprimées spécifiquement dans les tissus sensoriels

Une expression spécifique des ODE dans les organes sensoriels a été mise en évidence chez les mammifères (Bond *et al.*, 1988). En effet, plusieurs CYP (CYP1A1, CYP2G1 et CYP2B) sont spécifiquement exprimés dans la muqueuse olfactive chez l'homme, le rat et le lapin (Heydel *et al.*, 2013, Nef *et al.*, 1989).

Chez les insectes, plusieurs études ont montré que l'expression de certaines ODE était restreinte aux organes sensoriels chez plusieurs espèces telles que les diptères (*Drosophila melanogaster* (Wang *et al.*, 2008)), les coléoptères (*Phyllopertha diversa*, *Antheraea polyphemus* (Wojtasek & Leal 1999)), et les lépidoptères (*Mamestra brassicae*, *Spodoptera littoralis*, *Bombyx mori*, (Bozzolan *et al.*, 2014, Chertemps *et al.*, 2012, Maibeche-Coisne *et al.*, 2002, Maida *et al.*, 1995).

La caractérisation spécifique des ODE dans les tissus sensoriels serait en accord avec l'hypothèse d'un rôle de ces enzymes dans la modulation de la perception du signal chimiosensoriel.

Tout d'abord, l'expression de trois CYP microsomaux (CYP4s4, CYP6w1 et CYP4l4) a été observée dans les sensilles courtes et longues de type trichoïdes des antennes du papillon mâle *Mamestra brassica*. L'enzyme CYP4S4 est spécifiquement exprimée dans les antennes alors que les CYP4L4 et CYP6W1 s'expriment également dans le proboscis et les pattes, ce qui suggère une implication de ces CYP dans l'arrêt du signal des molécules sensorielles à la fois dans les neurones portant les récepteurs olfactifs et gustatifs (Maibeche-Coisne *et al.*, 2002).

Une glutathion-S-transférase (GST) et certaines aldéhydes oxydases (AOX), impliquées dans la dégradation des phéromones, ont été spécifiquement et respectivement caractérisées dans l'antenne d'un papillon *Manduca sexta* (Rogers *et al.*, 1999) et dans les organes olfactifs du papillon *Mamestra brassicae* (Merlin *et al.*, 2005).

De plus, plusieurs ODE exprimées dans les organes olfactifs ont été identifiées chez *Drosophila melanogaster*. En effet, Wang *et al* (1999) ont mis en évidence une expression préférentielle de plusieurs UGT (UGT35a et UGT35b1) et un CYP (CYP6w1) dans le 3^{ème} fragment antennaire et l'expression spécifique d'une déshydrogénase (AntDH) dans l'antenne.

Chapitre 3: Les évènements péri-récepteurs

L'aspect novateur de cette étude réside dans l'identification d'un domaine transmembranaire en position C-terminal des UGT qui est conservé chez les vertébrés. Cette étude émet la possibilité que les EMX puissent être exprimées au niveau de la membrane des cellules présentes dans l'environnement du récepteur (neurones ou cellules de soutien). Le site actif de cette enzyme serait dirigé vers la lymphe sensillaire et métaboliserait les molécules sensorielles présentes dans la lymphe assurant ainsi la dynamique du récepteur (Wang *et al.*, 2008). Une étude réalisée chez la levure a montré que CYP2D6, qui présente cette même conformation, était fonctionnel (Loeper *et al.*, 1998).

Une étude pionnière de Bozzolan et ses collaborateurs (2014) a caractérisé pour la première fois une UGT spécifiquement exprimée dans l'antenne du coléoptère *Spodoptera littoralis*. Cette étude a établi le profil d'expression de l'*UGT46a6* au cours du développement entre mâles et femelles. Ils ont montré que l'*UGT46a6* s'exprime à l'âge adulte et plus fortement chez le mâle (facteur 2,4). Ils ont également caractérisé son expression à la base de la sensille olfactive, potentiellement dans les cellules accessoires ou les neurones. Le niveau d'expression de l'*UGT46a6* a été mesurée après une exposition à plusieurs molécules (un odorant de la plante hôte (Z3-6:Ac) / une phéromone sexuelle (Z9E11-14:Ac) / un insecticide le deltaméthrine).

Pour la première fois, ils ont montré que l'expression transcriptionnelle de l'*UGT46a6*, spécifiquement exprimée dans l'antenne, est régulée par des composés olfactifs suggérant une implication de cette enzyme dans la chimioprotection et le maintien de l'homéostasie des organes sensoriels. Cependant, l'activité métabolique de l'*UGT46a6* n'a pas été clairement démontrée par des approches biochimiques (Bozzolan *et al.*, 2014).

Récemment, deux carboxylestérases (SICXE10 et SICXE7) ont été caractérisées dans les antennes du papillon de nuit mâle *Spodoptera littoralis*. Ces deux carboxylestérases sont exprimées dans les sensilles courtes et longues de type trichoïdes. Les auteurs de cette étude ont montré, d'une part, que l'enzyme SICXE10, localisée dans le cytoplasme des cellules de soutien, est capable de dégrader les odeurs de la plante hôte de ce papillon. D'autre part, l'enzyme SICXE7, qui pourrait être une enzyme extracellulaire, est capable d'hydrolyser deux phéromones sexuelles et les composés volatiles de la plante hôte. Cette étude met en évidence que l'activité d'une enzyme peut évoluer selon sa localisation sensillaire (Durand *et al.*, 2011, Durand *et al.*, 2010, Durand *et al.*, 2012).

Une autre estérase circulante a été identifiée dans l'antenne du papillon *Mamestra brassicae* mâle et femelle. Cette enzyme Mbra-Est est exprimée dans les sensilles olfactives de type trichoïdes sensibles aux phéromones et aux odeurs volatiles de la plante hôte (Maibeche-Coisne *et al.*, 2004a).

Chez les lépidoptères, 2 types majeurs d'ODE extracellulaires spécifiquement exprimées dans les antennes ont été identifiés. La première est une estérase sensillaire (ApolSE) identifiée chez *Antheraea polyphemus* et la seconde une aldéhyde oxydase identifiée chez *Manduca sexta* et *Bombyx mori* (Maida *et al.*, 1995, Rybczynski *et al.*, 1989, Rybczynski *et al.*, 1990, Vogt & Riddiford 1981).

La localisation cellulaire des ODE pouvant être intracellulaire, membranaire ou extracellulaire, plusieurs hypothèses expliquant leurs mécanismes d'action ont vu le jour. En effet, plusieurs études ont d'abord suggéré que seules les OBP participaient à l'inactivation des récepteurs en séquestrant les molécules sensorielles. Suite à la mise en évidence de l'activité métabolique de certaines ODE à proximité des récepteurs, il est devenu évident que les ODE font partie des évènements péri-récepteur. Les ODE extracellulaires se chargent des molécules sensorielles présentes dans la lymphe alors que les ODE intracellulaires dégradent les molécules sensorielles ou leurs métabolites qui ont été internalisés dans les cellules voisines (neurones ou cellules de soutien).

3.2.2- Affinité des molécules odorantes pour les EMX sensorielles

Chez les mammifères, les molécules odorantes sont plus efficacement métabolisées par les tissus olfactifs que par le foie qui est supposé être l'organe majeur de détoxification (Lazard *et al.*, 1991, Leclerc *et al.*, 2002, Merlin *et al.*, 2005). Ceci laisse à penser qu'il existe une affinité particulière entre les xénobiotiques et les EMX sensorielles et / ou qu'il existe des isoformes spécifiques d'EMX dans les tissus sensoriels. Cette affinité a été démontrée chez la mouche domestique *Musca domestica* dont le métabolisme de la phéromone 9-tricosène était plus important dans les antennes de mâles que dans les autres tissus (Ahmad *et al.*, 1987).

3.2.3- Les EMX et l'arrêt du signal sensoriel

Depuis la découverte des EMX dans les tissus olfactifs des mammifères et compte tenu de leur fonction, l'implication de ces enzymes dans la modulation de la perception sensorielle a été évoquée à plusieurs reprises. Toutefois, encore très peu d'études se sont véritablement intéressées à la fonction de ces enzymes dans l'arrêt du signal sensoriel et la dynamique de clairance des récepteurs.

Lazard *et al* (1991) ont été les premiers à impliquer les EMX et plus particulièrement les UGT dans la terminaison du signal. Après avoir identifié et localisé UGT2A1 dans l'épithélium olfactif de rat, ils ont montré *in vitro* que les molécules odorantes glucuronoconjuguées n'entraînaient plus la formation d'AMP cyclique, messenger secondaire de la transduction du signal, au niveau des cils olfactifs. Autrement dit, l'ajout d'un glucose à la molécule odorante change irréversiblement son affinité pour les récepteurs olfactifs entraînant une baisse de l'activité de transduction et suggérant un rôle des UGT dans la terminaison du signal (Lazard *et al.*, 1991).

Par la suite, notre équipe a montré que les molécules odorantes qui étaient plus activement glucuronoconjuguées par la muqueuse olfactive *in vitro*, provoquaient une faible réponse électrique mesurée *in vivo* au niveau du bulbe olfactif et inversement (Leclerc *et al.*, 2002). Cette corrélation met en lumière un impact du métabolisme sur la perception sensorielle.

Plus récemment, Thiebaud et ses collaborateurs (2013) ont mis en évidence que la biotransformation d'odorants (quinoléine et coumarine) entraînait une modulation du signal sensoriel dans l'épithélium olfactif de rat. Tout d'abord, il a démontré *in vitro* que des EMX étaient responsables de la biotransformation de ces odorants dans la muqueuse olfactive. De plus, il a également mis en évidence que l'hydroxylation et la glucuronoconjugaison de ces odorants provoquaient respectivement une diminution et une inhibition de la réponse olfactive mesurée par électro-olfactogramme. A l'inverse, il a montré qu'une application d'un inhibiteur de CYP et de ces odorants entraînait une augmentation de la réponse olfactive. Ces résultats innovants montrent, sans ambiguïté, l'implication d'EMX dans la modulation et ou l'arrêt du signal sensoriel (Thiebaud *et al.*, 2013).

Chez les insectes, l'implication des ODE dans la dynamique de clairance du récepteur et l'arrêt du signal reste très controversée. Des incubations *in vitro* d'extraits antennaires d'*Antheraea polyphemus* avec une phéromone sexuelle ont montré que la cinétique de dégradation *in vivo* de la phéromone par l'estérase circulante ApolSE est comprise entre 0,6 msec et 15 msec (Ishida & Leal 2005, Rybczynski *et al.*, 1989) alors que chez *Bombyx mori*, d'autres études ont rapporté une période de demi-vie de la phéromone de l'ordre de la minute. Ce dernier constat n'est pas compatible avec un mécanisme de dynamique de clairance rapide du récepteur.

Plusieurs études ont décrit une activité enzymatique de ces ODE dans les sensilles olfactives. Par exemple, l'étude de Wojtasek *et al* (1999) montre que chez le scarabée *Phyllopertha diversa*, un CYP membranaire est capable de dégrader *in vitro* dans un extrait antennaire, la phéromone sexuelle: 1,3-diméthyl-2,4-(1H, 3H)-quinazolinedione (DMQ) en présence de cofacteurs NADH ou NADPH.

En effet, l'incubation d'extraits antennaires avec la phéromone (DMQ) et le cofacteur provoque la dégradation enzymatique de la phéromone. Afin de s'assurer de la spécificité du mécanisme catalytique, ils ont incubé les extraits antennaires avec de la caféine qui est une molécule structuralement proche de la phéromone DMQ et dont le métabolisme est connu pour être dépendant des CYP chez les vertébrés. Ils ont détecté une faible dégradation de la caféine en théophylline, ce qui traduit une importante spécificité enzyme-substrat. Par la suite, l'utilisation d'un inhibiteur des CYP, le métyrapone, a permis de démontrer que la dégradation de la phéromone DMQ était spécifique à ce CYP. Pour aller plus loin, ils ont réalisé la même expérimentation sur 12 autres espèces proches du coléoptère *Phyllopertha diversa* mais ils n'ont pas observé d'activité enzymatique suggérant que ce CYP, en particulier, a évolué dans cette espèce de Coléoptère, avec une forte affinité et spécificité pour la dégradation de cette phéromone DMQ (Wojtasek & Leal 1999).

Par la suite, l'étude précédente a été complétée par Maibèche-Coisne et ses collaborateurs (2004b), qui, en utilisant une approche bio-informatique, ont cloné 3 CYP (*CYP4w1*, *CYP4w2* et *CYP6at1*) exprimés dans l'antenne mâle de *Phyllopertha diversa*. Le candidat CYP4W1 dont l'expression est spécifiquement restreinte à l'antenne a été sélectionné dans le but de déterminer si cette enzyme est capable de dégrader la phéromone DMQ *in vivo* en utilisant une approche électrophysiologique. La sensille abritant les neurones sensibles à la phéromone a été exposée à de fortes doses de DMQ puis du métyrapone a été appliqué sur le haut de la sensille

Chapitre 3: Les évènements péri-récepteurs

pour qu'il puisse pénétrer dans la lymphe sensillaire par diffusion. Ils ont ensuite stimulé à plusieurs reprises avec des doses physiologiques de phéromone la sensille et ils ont observé une désensibilisation du neurone pendant quelques minutes.

Cette étude a mis en évidence que la modification de l'activité enzymatique d'un CYP est capable de modifier la réponse électrophysiologique du neurone sensible à une phéromone sexuelle. Comme dans l'étude de Wojtasek, ils ont voulu également s'assurer de la spécificité d'action de cette enzyme. Pour cela, ils ont mesuré la réponse électrophysiologique du neurone en présence de métyrapone et d'un odorant de la plante hôte de ce papillon: le Z-3 hexenyl acetate. Le métyrapone n'a pas eu d'effet sur la perception de cette odeur montrant à nouveau la spécificité de CYP4W1 pour la phéromone. Cette étude *in vivo* a également été transposée à 12 autres espèces d'insectes et aucune perturbation de la réponse électrophysiologique n'a été constatée. Ces deux études complémentaires confirment que chez *Phyllopertha diversa*, CYP4W1 est indispensable pour la dégradation de la phéromone DMQ (Maibèche-Coisne *et al.*, 2004b).

Chez *Drosophila melanogaster*, l'estérase-6 est connue pour son rôle dans la reproduction. En effet cette enzyme est transmise par le mâle à la femelle pendant l'accouplement va diffuser dans l'hémolymph de la femelle et provoquer une augmentation de l'oviposition et une diminution de la réceptivité de la femelle pour les autres mâles (Richmond *et al.*, 1980).

Récemment, l'estérase-6 circulante a été identifiée chez *Drosophila melanogaster* dans les sensilles olfactives de type trichoïdes chez les mâles et elle est capable de dégrader le cVA (Chertemps *et al.*, 2012). Les auteurs de cette étude ont mesuré la réponse électrophysiologique et comportementale vis à vis du cVA des individus mutants pour l'Estérase-6. Ils ont mis en évidence chez les individus mutants une perturbation du comportement de cour et de la réponse électrophysiologique du neurone portant OR67d sensible au cVA. D'un point de vue comportemental, les individus mutants montrent une réponse diminuée et une initiation retardée du comportement de cour. De plus, l'activité des neurones portant OR67d est plus importante et prolongée chez les individus mutants. Ces observations suggèrent que l'estérase-6 dégrade le cVA. La perturbation de l'activité enzymatique de l'estérase a provoqué des modifications dans la transduction du signal du cVA entraînant des changements comportementaux. Il a été montré que cette estérase présente de multiples rôles allant de la reproduction à l'olfaction (Chertemps *et al.*, 2012).

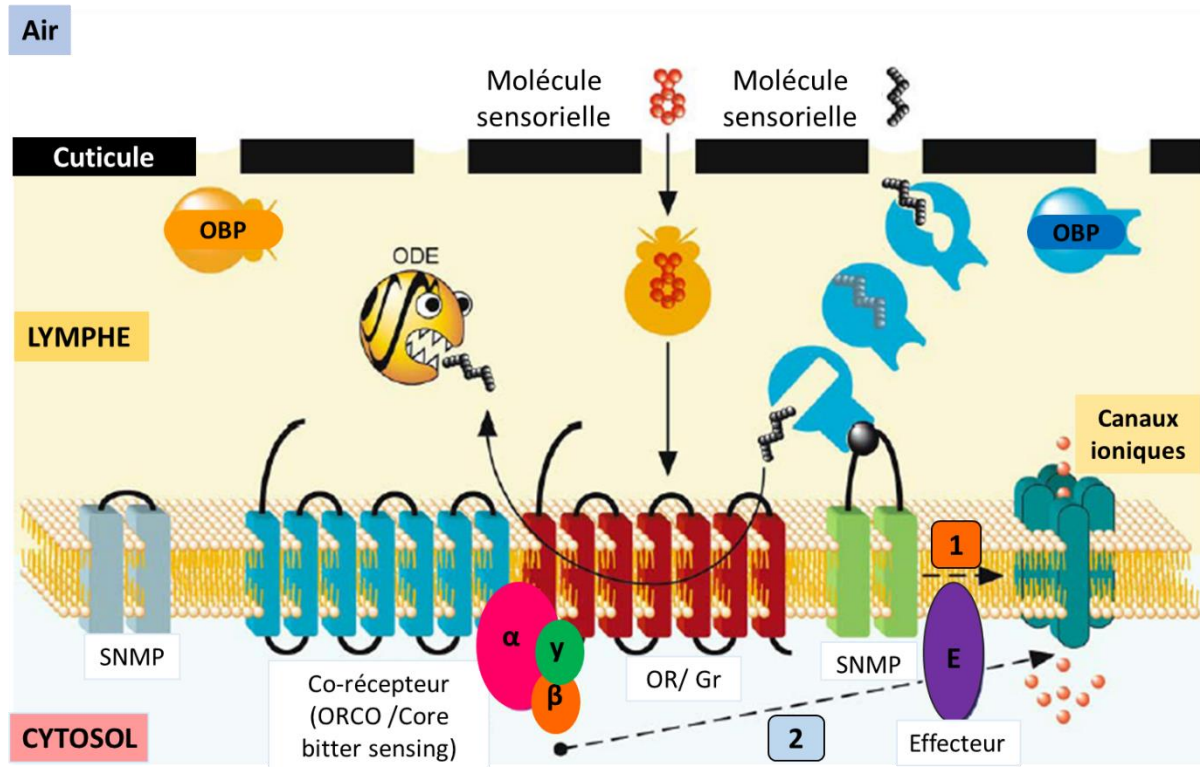


Figure 13: Représentation de la localisation et des interactions entre les protéines, participant aux événements péri-récepteurs, présentes dans la lymphe sensillaire et au niveau du neurone sensoriel d'insecte.

En traversant le ou les pores de la cuticule, les molécules sensorielles pénètrent dans la lymphe sensillaire où elles sont captées par les OBP. Le rôle des OBP est de prendre en charge, protéger et transporter les molécules sensorielles jusqu'aux récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique de la dendrite. L'interaction ligand / récepteur permet d'induire la transduction du signal. Les stimuli sensoriels sont ensuite pris en charge, dégradés puis éliminés par les ODE afin d'assurer la clairance des récepteurs leur permettant de répondre à d'autres stimuli. Afin d'induire un signal sensoriel, les récepteurs conventionnels s'associent à un co-récepteur. Plusieurs études ont avancé l'hypothèse d'une transduction du signal à 2 vitesses. Une première voie rapide et courte provoquée par l'ouverture de canaux ionotropiques et une seconde voie métabotrope, lente et prolongée, provoquée par l'activation de protéines G et d'effecteurs (Plcβ). Modifié à partir de (Rutzler & Zwiebel 2005, Weiss *et al.*, 2011).

Chapitre 3: Les évènements péri-récepteurs

Enfin, un lien a également été montré entre le comportement agressif de la drosophile et l'expression d'un CYP. Une diminution de l'expression du gène *CYP6a20* dans l'antenne est observée dans les lignées sélectionnées pour une agressivité accrue. L'enzyme CYP6A20 pourrait donc être impliquée dans la perception de phéromones régulant l'agressivité. Toutefois, l'activité métabolique de CYP6A20 n'a pas été clairement démontrée par des approches biochimiques (Wang *et al.*, 2008).

Comme le montre les exemples ci-dessus, il existe quelques arguments en faveur d'un rôle des ODE dans la modulation du signal chimiosensoriel. Par ailleurs, compte tenu des différentes biotransformations exercées par ces enzymes, il n'est pas exclu que les métabolites libérés dans le mucus ou la lymphe aient des propriétés de stimulus ou rentrent en compétition avec d'autres stimuli présents (**Figure 13**).

Chapitre 4: La caféine - Propriétés, Actions et Métabolisme

4- Généralités

La caféine (1,3,7-triméthylxanthine) est un métabolite secondaire appartenant à la famille des alcaloïdes et plus particulièrement à la famille des méthylxanthines (Ashihara *et al.*, 2008). D'origine végétale, la caféine est à ce jour la molécule psychostimulante la plus consommée au monde. Elle est connue depuis des milliers d'années et elle est très présente dans notre culture. On retrouve cette molécule au goût amer sous différentes formes, notamment dans les boissons telles que le café, le thé, les sodas industriels, les boissons énergisantes, ainsi que dans des spécialités pharmaceutiques et compléments alimentaires (Chou & Benowitz 1994).

La caféine est retrouvée dans les graines, les feuilles et les fruits de plusieurs espèces végétales de différentes familles originaires d'Amérique du Sud principalement mais aussi d'Asie et d'Afrique (Ashihara & Crozier 2001, Ashihara & Suzuki 2004). Elle est souvent accompagnée d'autres alcaloïdes, notamment des méthylxanthines comme la théobromine et théophylline et des polyphénols (Nathanson 1984, Uefuji *et al.*, 2003).

4.1- Propriétés

4.1.1- Effets de la caféine chez les mammifères

De nombreux effets de la caféine ont été dénombrés, notamment au niveau du système nerveux central (Lorist *et al.*, 1994a), cardiaque (Lieberman *et al.*, 1987), respiratoire, gastro-intestinal, excréteur mais également sur le métabolisme.

Au niveau du système nerveux central, la caféine exerce un effet désinhibiteur et psychostimulant entraînant une augmentation de la vigilance (Lorist *et al.*, 1994b) en diminuant le temps de réaction à certaines tâches et de l'éveil (Lorist *et al.*, 1994a). En effet, la caféine augmente le délai d'endormissement, rend le sommeil moins profond pouvant en altérer sa qualité et abaisse le seuil de réveil.

De plus, la caféine entraîne à la fois une augmentation du rythme cardiaque et du flux sanguin en dilatant les vaisseaux sanguins (Astrup *et al.*, 1990, Green & Suls 1996) et une relaxation des muscles lisses de bronches stimulant ainsi la respiration (Fredholm 1984b).

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

La caféine est employée sur des nouveau-nés pour traiter l'apnée du sommeil afin de rectifier des battements du cœur irréguliers (Schmidt 2005) ainsi que dans le traitement de l'asthme (Welsh *et al.*, 2010).

Au niveau gastro-intestinal, la caféine stimule les sécrétions digestives et relaxe les muscles lisses intestinaux (Fredholm 1984c) et a également un effet diurétique (Fredholm 1984a). En effet, l'administration moyenne de 300 mg de caféine engendre dans les deux heures post-ingestion une augmentation significative du volume urinaire de 29 % en moyenne (Massey & Wise 1992). Enfin, au niveau métabolique, la caféine entraîne une augmentation de la thermogénèse avec une stimulation de la lipolyse (Fredholm 1984c).

De plus, la caféine affecte également les performances physiques, en effet, elle agit au niveau des muscles striés en renforçant les contractions musculaires et en augmentant le travail musculaire (Fredholm 1984b). Elle améliore la résistance à l'effort et ingérée avant un exercice d'endurance, la caféine retarde l'installation de la fatigue (Graham *et al.*, 1994) et améliore les paramètres ventilatoires (Brown *et al.*, 1991).

La caféine est présente dans de nombreux médicaments délivrés sur ordonnance ou vendus sans ordonnance, notamment contre la migraine (Graham 1954), la douleur (Derry *et al.*, 2012), l'asthme (Welsh *et al.*, 2010). La teneur en caféine de ces médicaments varie de 7mg à 200mg par comprimé.

La caféine est également utilisée dans le traitement de maladies plus complexes. En effet, combinée à l'éphédrine, la caféine est utilisée dans le traitement de l'obésité (Astrup *et al.*, 1992a, Astrup *et al.*, 1992b). D'autres études ont suggéré un rôle protecteur de la caféine sur le système nerveux. La consommation de caféine modérée sur le long terme préviendrait le déclin cognitif lié à l'âge (Arendash *et al.*, 2006, Eskelinen & Kivipelto 2010, Rosso *et al.*, 2008) et diminuerait les risques de développer des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer (Arendash & Cao 2010, Arendash *et al.*, 2006, Dall'Igna *et al.*, 2003, Eskelinen & Kivipelto 2010) et Parkinson (Ascherio *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2001).

D'autre part, la caféine est connue pour avoir des effets divers sur l'humeur allant de la stimulation agréable et la bonne humeur à la nervosité et irritabilité (Brice & Smith 2002, Lorist *et al.*, 1994a). Cependant ces effets restent très dépendants des habitudes de consommation de café, de la sensibilité individuelle et de la dose absorbée (Goldstein *et al.*, 1965).

D'autres études ont rapporté que la caféine stimule l'apprentissage en renforçant les capacités de concentration (Angelucci *et al.*, 2002, Nawrot *et al.*, 2003, Smith 2002).

4.1.2- Toxicité de la caféine

Une consommation excessive de caféine peut être responsable de symptômes comprenant anxiété, tremblements, agitation, agressivité, dépression, tachycardie, palpitations, hypertension, anorexie, troubles du sommeil, idées dépressives et divers plaintes somatiques : brûlure épigastrique et épisodes diarrhéiques. Ces symptômes de surdosage ou d'intoxication à la caféine sont regroupés sous le terme de caféinisme (Victor *et al.*, 1981) sans être un véritable syndrome et touche les gens ayant une consommation journalière dépassant 1 g de caféine (Chou & Benowitz 1994).

Tout comme les effets stimulants de la caféine, les effets indésirables sont sujets à une très grande variabilité individuelle et le développement d'une tolérance (Goldstein *et al.*, 1965).

4.2- Effets de la caféine sur les insectes

Diverses études s'intéressent aux multiples rôles et effets de la caféine dans les interactions plantes-prédateurs/pollinisateurs ou dans les interactions plantes-plantes mais également sur la physiologie de l'animal (Mustard 2014).

4.2.1- Caféine: une molécule toxique

Pour aller plus loin, d'autres études ont montré l'effet toxique voire mortel de la caféine. Il a été montré chez *Drosophila melanogaster* que l'espérance de vie moyenne des individus élevés sur un milieu contenant 13mM de caféine est significativement réduite. Les individus contrôles vivent en moyenne 46 jours alors que les individus élevés sur un milieu supplémenté en caféine vivent environ 19 jours (Nikitin *et al.*, 2008).

D'autres études ont rapporté qu'une exposition prolongée à la caféine est fatale pour les limaces et une application topique de 0,1 % de caféine est létale pour les serpents (Hollingsworth *et al.*, 2002). Par ailleurs, Il a été également montré que la caféine est capable de perturber les capacités de reproduction de certains papillons tels que *Manduca sexta*. (Mathavan *et al.*, 1985).

4.2.2- Caféine – un répulsif naturel: interactions Plantes / Prédateurs

Afin d'expliquer les hautes concentrations de caféine accumulées chez diverses espèces de caféiers et de théiers, deux hypothèses suggèrent que la caféine serait impliquée dans des mécanismes de défenses chimiques (Ashihara & Crozier 2001, Ashihara & Suzuki 2004, Kim *et al.*, 2010b) et allélopathiques (Anaya *et al.*, 2006, Smyth 1992, Waller 1989).

Tout d'abord, la théorie suggérant le rôle de la caféine dans la défense chimique des plantes propose que la caféine synthétisée au niveau des jeunes feuilles, des fruits immatures et des bourgeons permettrait de protéger les tissus en développement contre l'attaque de prédateurs dont les insectes herbivores. (Hollingsworth *et al.*, 2002, Mathavan *et al.*, 1985, Nathanson 1984, Uefuji *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont mis en évidence la nature répulsive de la caféine ainsi que sa capacité à inhiber la prise alimentaire des insectes. Par exemple, une étude a montré que la vaporisation de feuilles de tomates avec une solution à 1 % de caféine permet de diminuer drastiquement la consommation des larves du papillon *Manduca sexta* (Nathanson 1984). De la même manière, les feuilles de chou chinois *Brassica rapa* vaporisées avec une solution de caféine de 0.01 % ne sont pas attaquées par les limaces. (Hollingsworth *et al.*, 2002).

De plus, Uefuji *et al* (2005) ont généré des feuilles transgéniques de tabac sur-exprimant les gènes de la voie de biosynthèse de la caféine afin de produire plus de 5µg de caféine par gramme de feuille sèche. Ils ont mis en évidence d'une part que la larve du sphinx du tabac, au cours d'un test de choix distingue les feuilles transgéniques des feuilles contrôles et consomment préférentiellement les feuilles de tabac contrôles. D'autre part, ils ont montré que lorsque les feuilles de tabac transgéniques sont la seule source de nourriture, la consommation des larves est nettement diminuée.

L'ensemble de ces études a clairement mis en évidence le rôle d'insecticide naturel et les effets répulsifs de la caféine (Uefuji *et al.*, 2005).

De plus, diverses études ont mis en évidence la présence de la caféine dans le nectar des plantes. Étant donné que les insectes sont nécessaires à la pollinisation des plantes, la présence d'une molécule aversive est surprenante. Des études récentes ont mis en évidence à l'aide de tests comportementaux sur les abeilles, l'effet stimulant et bénéfique de la caféine sur la

mémoire des insectes pollinisateurs. Ces études suggèrent que la présence de la caféine dans le nectar permet à la plante de manipuler le comportement des pollinisateurs en s'assurant ainsi une pollinisation fréquente (Wright *et al.*, 2013).

4.3- Caféine: Interactions – Plantes / Plantes

La théorie de l'agent allélopathique propose que la caféine contenue dans les graines des plantes soit rejetée dans le sol provoquant une inhibition de la germination d'autres plantes (Chou & Waller 1980, Waller 1989). Par exemple, une étude a mis en évidence que la caféine inhibe complètement la germination de la plante comestible *Amaranthus spinosum*. (Rizvi *et al.*, 1981).

4.4- Effets de la caféine sur la physiologie de l'insecte

Chez les mammifères de nombreuses études ont montré que la caféine est capable d'agir sur la locomotion, le sommeil mais également sur des aspects plus cognitifs tels que l'apprentissage et la mémoire.

4.4.1- Rôle de la caféine sur la locomotion et le sommeil

Chez les mammifères, une consommation de caféine permet d'augmenter les capacités locomotrices, l'éveil et l'attention. Diverses études s'interrogent sur la conservation de ces effets chez les insectes.

Ce postulat a été confirmé chez de nombreuses espèces d'insectes tels que l'abeille *Apis mellifera* (Ishay & Paniry 1979), la cochenille verte *Coccus viridis*, (Fernandes *et al.*, 2012) la drosophile *Drosophila melanogaster* (Wu *et al.*, 2009) et quelques coléoptères *Tribolium castaneum* (Nakayama *et al.*, 2012) et *Tribolium confusum* (Nishi *et al.*, 2010). Une consommation de caféine entraîne une augmentation de l'activité locomotrice. Toutefois, une forte concentration de caféine est capable d'inhiber la nage chez la méduse *Aurelia aurita* (Schwab 1977) suggérant des effets antagonistes de la caféine dépendant de la concentration utilisée.

Les effets de la caféine sur le sommeil ont été bien décrits chez la drosophile. Diverses études ont mis en évidence une corrélation entre la concentration de caféine et la diminution du temps des individus passé à dormir. Ces études ont montré que la caféine perturbe le cycle du

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

sommeil, en augmentant le temps passé éveillé et en modifiant le rythme circadien (Andretic *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2009). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez les mammifères, la caféine affecte le temps de sommeil et les temps passés dans chaque stade, altérant ainsi la qualité du sommeil.

Ces études ont montré une conservation des caractéristiques du sommeil, telles que la régulation circadienne et homéostatique du sommeil (Hendricks *et al.*, 2000) ainsi que les effets rebonds après une privation de sommeil (Shaw *et al.*, 2000) suggérant une éventuelle conservation des mécanismes d'action de la caféine chez les invertébrés.

4.4.2- Les effets de la caféine sur l'apprentissage et la mémoire

Chez l'homme, l'effet de la caféine dans l'apprentissage et la mémoire n'est pas clairement établi. Toutefois, chez les insectes des études ont clairement démontré ce lien mais ce dernier reste controversé.

Tout d'abord, certaines études ont montré que l'utilisation de fortes concentrations de caféine (10-50mM) ne permet pas d'améliorer les capacités d'apprentissage. Par exemple, chez la drosophile, une exposition de 20 heures à la caféine diminue sa capacité à associer une image à un stimulus aversif (Folkers & Spatz 1984a, b, Wang *et al.*, 1998). De la même manière, une exposition à la caféine diminue la capacité d'apprentissage olfactif chez les abeilles. Ces études ont également montré que la caféine n'avait pas d'effet sur la mémoire à long terme (Mustard *et al.*, 2012).

Par contre, d'autres études, utilisant des concentrations plus faibles de caféine (0.1-100µM), ont clairement démontré une augmentation de la capacité d'apprentissage chez les abeilles ainsi que la stimulation de la mémoire à long terme (Wright *et al.*, 2013).

Ces études ont permis de mettre en évidence que la concentration en caféine pouvait avoir des effets antagonistes sur les capacités d'apprentissage visuel, spatial et olfactif.

Un aspect intéressant a émergé de ces études d'apprentissage olfactif et visuel. Il semblerait que les effets positifs de la caféine soient plus marqués au cours de tests d'apprentissage dits plus complexes. Généralement, ces tests de comportement nécessitent davantage de périodes d'entraînement pour obtenir le même niveau de réponse.

Par exemple, des abeilles qui sont entraînées via un protocole de conditionnement olfactif prolongé (massed olfactory training) et stimulées par une solution récompense contenant de la caféine ont une capacité d'apprentissage olfactif plus rapide que des abeilles qui ont consommé une solution de récompense contenant uniquement du sucre (Wright *et al.*, 2013).

De plus, d'autres études ont montré les mêmes résultats en utilisant cette fois-ci des tests d'apprentissage d'association visuelle également appelés protocoles d'appariement retardé à la cible ou en anglais delayed-match-to-sample (DMST). Dans ce type de procédure, on présente un premier stimulus au sujet, suivi de 2 ou plusieurs stimuli parmi lesquels il doit faire son choix. Dans un DMST, le sujet doit choisir le stimulus identique au stimulus cible (Si *et al.*, 2005).

Par exemple, à 100 μ M, la caféine n'améliore pas les capacités d'apprentissage visuel avec un dispositif de choix en Y alors qu'à la même concentration, la caféine a un effet en utilisant un dispositif DMST (Si *et al.*, 2005). Ces études suggèrent que l'effet de la caféine sur l'apprentissage est subtil.

Par ailleurs, ces études ont montré que la consommation de caféine permet d'améliorer la mémoire à long terme. Par exemple, une étude a montré que les abeilles sont capables de reconnaître un nectar floral encore 24 heures après le test d'apprentissage lorsqu'elles sont récompensées avec une solution contenant du sucre et de la caféine (Si *et al.*, 2005). La consommation de caféine permet d'améliorer la sensibilité du système olfactif et la capacité de mémoire à long terme chez les abeilles. En utilisant des composés qui stimulent la mémoire comme la caféine, la plante s'assure la fidélité de ces pollinisateurs et une reproduction / pollinisation réussie.

4.5- Mode d'action

Chez les mammifères, la caféine agit principalement comme un inhibiteur compétitif de l'adénosine (Chou & Benowitz 1994) provoquant un effet désinhibiteur de l'activité neurale, entraînant la libération des neurotransmetteurs excitateurs (Mandel 2002) telles que la dopamine (Solinas *et al.*, 2002) et la sérotonine (Berkowitz & Spector 1971) et de l'hormone de stress: l'adrénaline.

Il existe 4 types de récepteurs à adénosine différents A1, A2a et A2b et A3, couplés aux protéines G entraînant soit l'inhibition (A1 et A3) ou la stimulation (A2) de l'adénylate cyclase

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

modifiant ainsi les taux d'AMP cyclique (AMPC) intracellulaires (Daly *et al.*, 1983). L'action de l'adénosine est complexe, car les effets de chacun des récepteurs peuvent être différents, voire même s'opposer. En général, l'AMPC inhibe la libération de neurotransmetteurs excitateurs (Dunwiddie & Fredholm 1985).

On connaît mieux les récepteurs A1 et A2a respectivement à haute et basse affinité pour l'adénosine. On retrouve les récepteurs A1 au niveau du système nerveux central, des bronches, des vaisseaux et du cœur alors que l'expression des récepteurs A2a est restreinte au niveau du cerveau et plus spécifiquement dans le striatum. Le striatum est une région du cerveau impliquée dans le mouvement et la nociception (gestion de la douleur) via le système dopaminergique (Daly *et al.*, 1983).

Lorsque la caféine se fixe aux récepteurs A1 et A2 à adénosine, elle entraîne l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase qui empêche la formation d'AMPC, lève l'inhibition de la sécrétion de neurotransmetteurs excitateurs et inhibe les récepteurs canaux GABAergiques (impliqués dans la relaxation musculaire, la diminution de la tonicité des muscles et le ralentissement du rythme cardiaque). L'antagonisme de l'adénosine par la caféine provoque l'augmentation de l'activité nerveuse avec la libération d'adrénaline et augmentation des niveaux de dopamine (Nehlig *et al.*, 1992, Shi *et al.*, 1993).

Cependant, certains des effets secondaires de la caféine sont probablement causés par des mécanismes non liés à l'adénosine. La caféine est connue pour être un inhibiteur compétitif de l'enzyme de dégradation de l'AMPC: AMPC-Phosphodiesterase (AMPC-PDE) qui convertit l'AMPC des cellules en sa forme non cyclique inactive, entraînant ainsi une accumulation d'AMPC dans les cellules (Fredholm *et al.*, 1999). En bloquant son élimination, la caféine intensifie et prolonge les effets de l'adrénaline et de la dopamine.

Enfin, la caféine active également les récepteurs à Ryanodine, entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire des cellules des muscles squelettiques et cardiaques et augmente leur force (Fredholm *et al.*, 1999).

Compte tenu des similitudes des effets de la caféine entre les mammifères et les invertébrés, certaines études suggèrent une conservation probable des mécanismes d'actions chez les invertébrés (**Figure 14**).

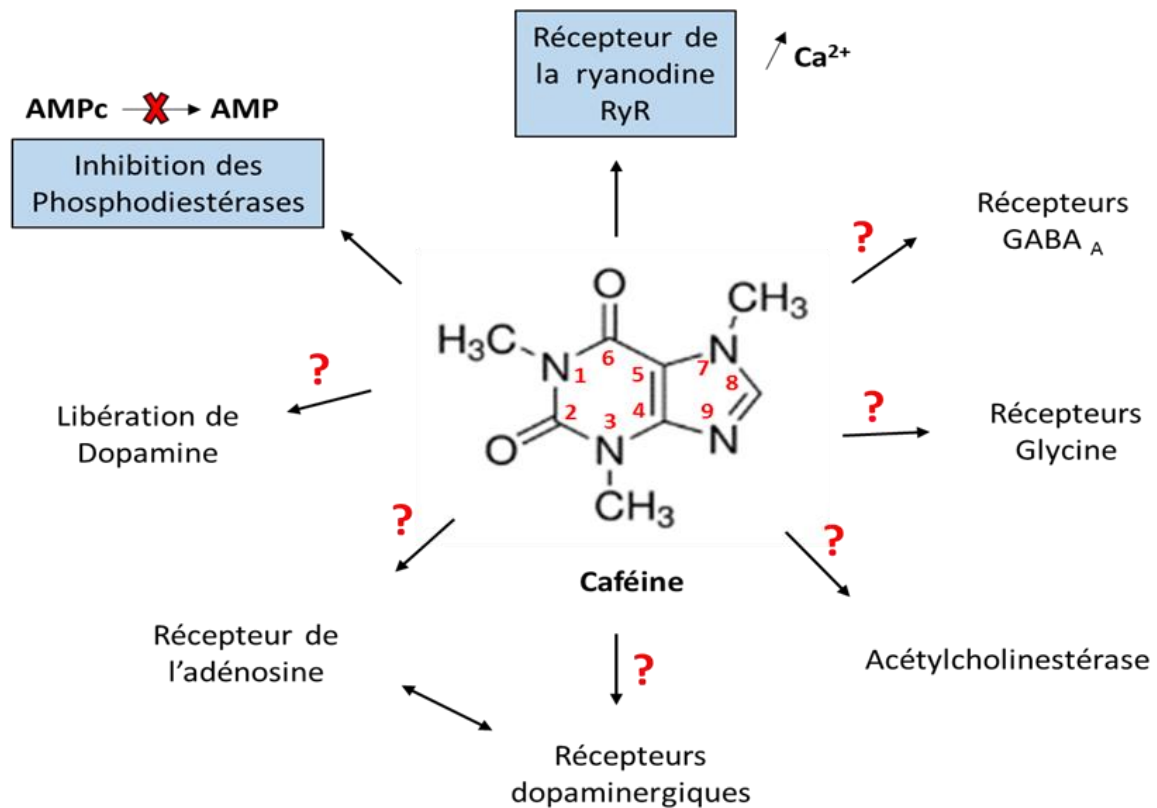


Figure 14: Mode d'action de la caféine chez les mammifères et chez les insectes.

Chez les mammifères, plusieurs mécanismes d'action de la caféine ont été identifiés: 1- l'interaction avec les récepteurs ryanodines entraînant une augmentation du niveau de calcium intracellulaire, 2- l'inhibition des phosphodiesterases (PDE) entraînant une augmentation du niveau d'AMPC intracellulaire, 3- l'effet antagoniste des récepteur à adénosine, 4- une modulation du niveau de la dopamine via les récepteur dopamine ou à adénosine, 5- une inhibition des récepteurs canaux GABA, des récepteurs glycine et une inhibition des acétylcholines estérases. Chez les insectes, seuls deux mécanismes ont été clairement mis en évidence: l'inhibition des phosphodiesterases (PDE) et l'interaction avec les récepteurs ryanodines. L'implication des récepteurs à adénosine et dopaminergique, entre autres, reste à élucider.

Chez les insectes, seuls deux de ces mécanismes ont été clairement mis en évidence: l'inhibition des phosphodiesterases (PDE) et l'interaction avec les récepteurs ryanodines (**Figure 14**).

En effet, chez *Drosophila melanogaster*, la consommation (Wang *et al.*, 1998) et l'application (Wu *et al.*, 2009) de caféine au niveau du cerveau entraîne une augmentation du niveau d'AMPC au niveau du système nerveux central suggérant une inhibition de PDE par la caféine. Le gène *dunce* code la phosphodiesterase AMPC PDE II chez la drosophile (Byers *et al.*, 1981). Cette protéine intervient dans plusieurs processus physiologiques notamment dans l'apprentissage (Nighorn *et al.*, 1994). De plus, un traitement avec un inhibiteur de cette enzyme

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

(IBMX) mime les effets de la caféine sur le sommeil (Wu *et al.*, 2009). Des études *in vitro* ont montré que ces enzymes purifiées ou des homogénats sont capables de lier la caféine et que cette dernière agit comme un inhibiteur compétitif chez de nombreux insectes. Des concentrations allant de 0,5 à 10mM sont nécessaires pour induire 50 % d'inhibition de l'activité des PDE (Mustard 2014).

De plus, d'autres études, chez l'abeille ont également montré qu'une application directe de caféine sur le cerveau entraîne une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (Perisse *et al.*, 2009, Rein *et al.*, 2013). Plusieurs études chez les nématodes (Robertson *et al.*, 2010), les insectes, les mollusques ainsi que chez les crustacés ont mis en évidence la capacité de la caféine (0.5 – 30mM) à activer les récepteur à ryanodines entraînant une augmentation de calcium intracellulaire. Ces résultats sont cohérents avec les concentrations de caféine nécessaires pour activer ces récepteurs chez les mammifères.

L'implication des récepteurs à adénosine reste à élucider. L'interaction de la caféine et les récepteurs à adénosine semble être la voie majoritaire d'action chez les mammifères, toutefois son implication chez les invertébrés reste controversée.

Plusieurs études pharmacologiques montrent que la caféine interagit avec les récepteurs à adénosine chez les invertébrés. L'utilisation de molécules antagonistes des récepteurs A1 et A2 chez les mammifères miment les effets de la caféine sur le sommeil de la drosophile (Andretic *et al.*, 2008) alors qu'un agoniste des récepteurs A1 agit de façon opposée à la caféine en augmentant le temps de sommeil chez la drosophile (Hendricks *et al.*, 2000). D'autre part, des études *in vivo*, chez l'abeille ont montré que l'activité des cellules Kanyon dans le corps pédonculé suite à l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à adénosine, mime les effets de la caféine (Wright *et al.*, 2013).

En revanche, à ce jour, un seul récepteur à adénosine a été cloné et caractérisé chez les insectes. DmelAdoR (*Drosophila melanogaster*) (Dolezelova *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2009) et PminAdoR chez l'étoile de mer (Kalinowski *et al.*, 2003). Ces deux récepteurs ne partagent que 36 % d'homologie de séquence et peu de séquences homologues avec les récepteurs orthologues des mammifères.

Des expériences d'expression hétérologue du récepteur de la drosophile dans des cellules de mammifères ont été réalisées. L'incubation des cellules avec de l'adénosine entraîne une

augmentation de la concentration en AMPc et de calcium intracellulaire (Dolezelova *et al.*, 2007). Par contre, lorsque des neuroblastes de drosophiles sont transfectés avec le récepteur DmelAdoR puis incubés avec de l'adénosine, on observe une augmentation de l'AMPc mais pas du calcium. La caféine a un effet sur le sommeil de ces mouches mutantes (KO) mais n'a pas d'effet antagoniste sur le niveau d'AMPc (Kucerova *et al.*, 2012).

Contrairement aux études pharmacologiques, ces études d'expression d'hétérologues montrent que la caféine n'a pas d'effet antagoniste sur les récepteurs à adénosine chez les invertébrés. Mais cela peut s'expliquer par le fait qu'un seul récepteur a été testé et que d'autres récepteurs à l'adénosine ou sensibles à la caféine sont probablement impliqués.

Chez les mammifères, la caféine interagit également avec la voie de signalisation de la dopamine. Chez les insectes, plusieurs études ont montré qu'une exposition à la caféine chez l'abeille entraînait une augmentation des ARNm du récepteur dopamine D2 (D-2 like dopamine receptor) (Kucharski & Maleszka 2005). D'autres études comportementales ont montré que des mouches mutantes pour le récepteur dopamine D1 (D-1 like dopamine receptor) est nécessaire pour la réduction du sommeil chez les mouches (Andreatic *et al.*, 2008). Ces études montrent un éventuel lien entre caféine et la voie de signalisation liée à la dopamine.

Chez les invertébrés, à ce jour, aucune étude ne montre un effet de la caféine sur l'inhibition des récepteurs GABA (Taketo *et al.*, 2004), l'inhibition compétitive des récepteurs glycine (Duan *et al.*, 2009) et l'inhibition des acétylcholinestérases (Pohanka & Dobes 2013).

4.6- Métabolisme de la caféine

4.6.1- Les propriétés pharmacocinétiques de la caféine

En Europe, les adultes consomment en moyenne 250 mg de caféine par jour (100-400 mg) essentiellement dans le café et le thé, mais aussi dans les boissons gazeuses et les boissons énergétiques (**Figure 15**). Toutefois, cette dose dépend considérablement des habitudes culturelles. Les pays d'Europe du Nord sont réputés pour leur très forte consommation de café: en Finlande, au Danemark, en Norvège ou en Suède, la consommation moyenne de caféine atteint en effet 400 mg par jour. La sensibilité à la caféine diffère considérablement d'une personne à l'autre, une consommation de 350mg par jour est une dose suffisante pour engendrer la dépendance.

La caféine, qui est le principe actif du café, est très rapidement et complètement absorbée par l'estomac et l'intestin grêle. Le coefficient de partage de 0.85 de la caféine indique que cette molécule à caractère lipophile modéré diffuse facilement dans les milieux liquides jusqu'aux organes (muscles et système nerveux) (Burg 1975) où elle est détectée 5 minutes après l'ingestion et le pic sanguin de caféine est atteint en 60 minutes (Arnaud 1987, Blanchard & Sawers 1983, Bonati *et al.*, 1982). La caféine a une faible affinité (10-30 %) pour les protéines contenues dans le plasma (albumine) (Blanchard & Sawers 1983). Le volume de distribution de la caféine est compris entre 0,5-0,75L/kg chez l'homme et de 0,9L/kg chez le rat (Arnaud 1987, Bonati *et al.*, 1982, Bonati *et al.*, 1984).

Le métabolisme hépatique de la caféine est dépendant des CYP. Seul 3 % de la caféine est éliminée sans être biotransformée (Berthou *et al.*, 1991, Tassaneeyakul *et al.*, 1994). La demi-vie de la caféine a été estimée entre 3 à 6 heures pour un individu adulte en bonne santé (Chou & Benowitz 1994). Toutefois, plusieurs facteurs peuvent modifier cette cinétique de dégradation (Grant *et al.*, 1983, Kalow 1985). Par exemple, la demi-vie de la caféine est plus courte chez les fumeurs (environ 2 heures) (Plowchalk & Rowland Yeo 2012) et plus longue chez les femmes sous contraceptifs oraux (5 à 10 heures), les femmes enceintes (9 à 11 heures) (Aldridge *et al.*, 1981) et chez les enfants (30 heures) (Aldridge *et al.*, 1979).



Figure 15: Distribution et quantification de la teneur en caféine des différents breuvages ou des produits largement consommés.

D'origine végétale, la caféine est à ce jour la molécule psychostimulante la plus consommée au monde. Par exemple, la consommation moyenne de caféine d'un français par an s'élève à 5,4 kg alors qu'elle atteint les 12,2 kg pour un finlandais. Elle est connue depuis des milliers d'années et est très présente dans notre culture. On la retrouve sous différentes formes, notamment dans les boissons telles que le café, le thé, les sodas industriels, les boissons énergisantes, ainsi que dans le chocolat mais également des spécialités pharmaceutiques et compléments alimentaires.

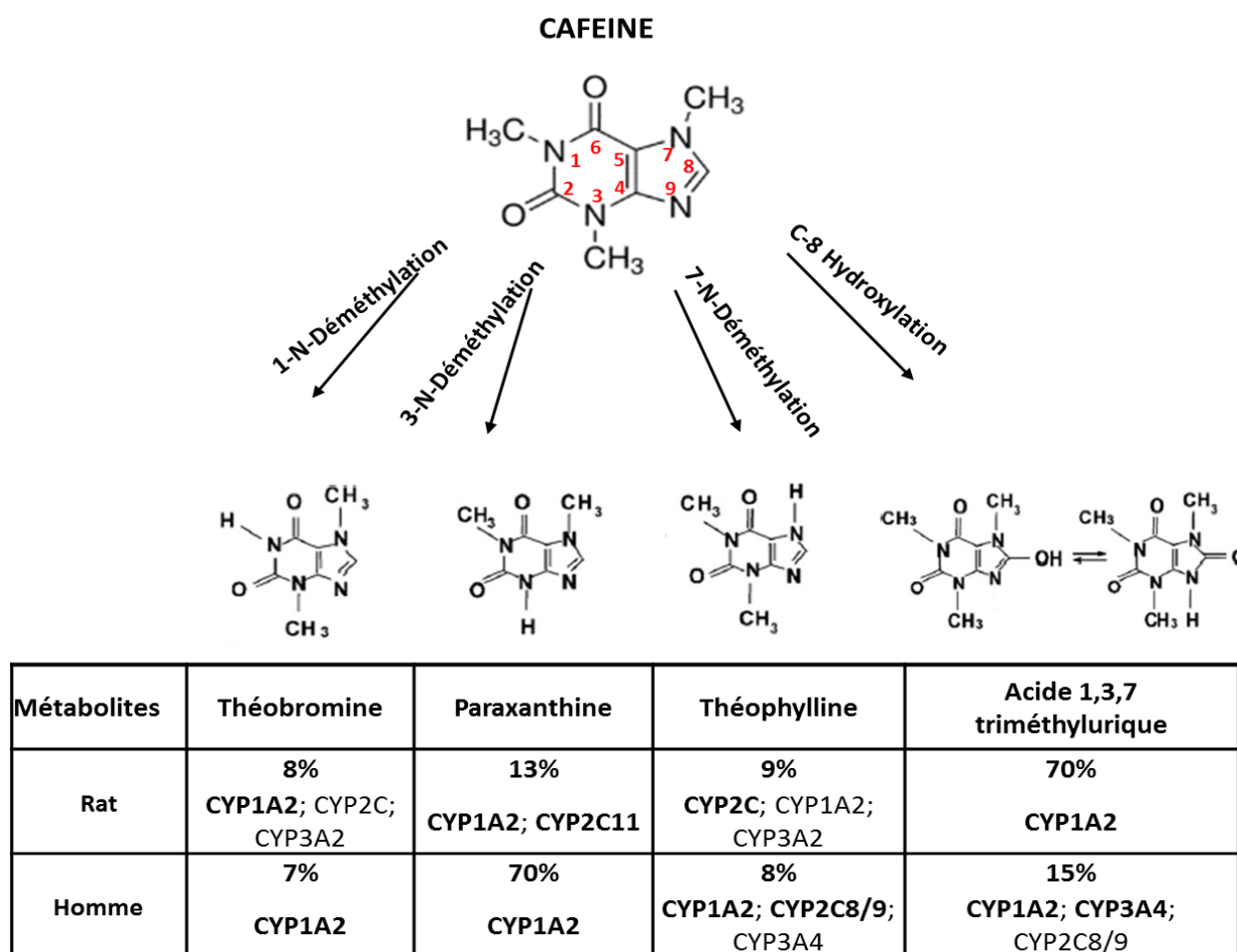


Figure 16: Métabolisme hépatique de la caféine chez l'Homme et le Rat: Contribution des différentes isoformes de CYP.

Chez les mammifères, le métabolisme hépatique de la caféine (1,3,7-triméthylxanthine) est principalement assuré par les enzymes de la famille des CYP et conduit à la formation de 4 métabolites principaux: la paraxanthine, la théobromine, la théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique. La théobromine, la paraxanthine et la théophylline sont respectivement générés par 3 réactions de déméthylation alors que la formation de l'acide 1,3,7-triméthylurique est générée par une réaction d'hydroxylation. Bien que les métabolites issus de la dégradation de la caféine soient conservés, leurs proportions ainsi que les CYP impliqués varient selon l'espèce animale. La ou les famille(s) majoritairement impliquée(s) dans la dégradation de la caféine pour chaque réaction sont indiqués en gras (Kot & Daniel 2008a).

4.6.2- Le métabolisme de la caféine

Le métabolisme hépatique de la caféine est dépendant des CYP chez les mammifères. La dégradation enzymatique de la caféine conduit à la formation de 4 métabolites principaux (**Figure 16**): la paraxanthine, la théobromine, la théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique (Berthou *et al.*, 1991, Bienvenu *et al.*, 1993, Kot & Daniel 2008b, c).

La théobromine, la paraxanthine et la théophylline sont respectivement générés par 3 réactions de déméthylation: 1-N-déméthylation (théobromine), 3-N- déméthylation (paraxanthine) et 7-N-déméthylation (théophylline) alors que la formation de l'acide 1,3,7-triméthylurique est générée par une réaction d'hydroxylation (8-C Hydroxylation) (**Figure 16**) (Kot & Daniel 2008a).

Bien que les métabolites issus de la dégradation de la caféine soient conservés, leurs proportions ainsi que les CYP impliqués varient selon l'espèce animale (Berthou *et al.*, 1992). Par exemple, chez l'Homme, la caféine est principalement dégradée en paraxanthine (70 %), en acide 1,3,7-triméthylurique (15 %) puis en théophylline (8 %) et théobromine (7 %) (Kot & Daniel 2008b) alors que chez le rat, le métabolite principal de la caféine est l'acide 1,3,7-triméthylurique (70 %). Les proportions de la paraxanthine, de la théophylline et de la théobromine représentent respectivement 13 %, 9 % et 8 % de la dégradation de la caféine (Kot & Daniel 2008c) (**Figure 16**).

Le métabolisme de la caféine chez les mammifères est catalysé principalement par CYP1A2. Cette enzyme s'avère être l'enzyme pivot de l'ensemble de la dégradation de la caféine. Toutefois, elle n'est pas la seule à catalyser le métabolisme de la caféine (Kot & Daniel 2008a).

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

Tableau 3: Comparaison de la contribution de chaque CYP dans la formation des 4 métabolites de la caféine à deux concentrations plasmatiques différentes de caféine: 100µM et 800µM chez le rat. Chez le rat, le métabolisme hépatique de la caféine est dépendant des CYP et conduit à la formation de 4 métabolites principaux: la paraxanthine, la théobromine, la théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique. L'activité catalytique des CYP est modulée par la concentration en caféine. A forte concentration de caféine, les proportions produites de métabolites par certaines enzymes sont modifiées suggérant une modification de l'expression transcriptionnelle de ces enzymes. Les différences majoritaires sont indiquées en rouge. Modifié à partir de (Kot & Daniel 2008c).

	Caféine 1-N-déméthylation		Caféine 3-N-déméthylation		Caféine 7-N-déméthylation		Caféine C-8 hydroxylation	
	Théobromine (%)		Paraxanthine (%)		Théophylline (%)		Acide 1,3,7 triméthylurique (%)	
	100µM	800µM	100µM	800µM	100µM	800µM	100µM	800µM
CYP1A2	37.5	22.6	47	19.2	14	5.4	72	30.4
CYP2A2	6.9	3.5	1.6	1.2	3.1	1.7	1	0.6
CYP2C6	6	6.7	5.2	2.8	27	24.5	6.5	6.1
CYP2C11	6	23.8	31	50.8	29	41.3	2.7	2.8
CYP2C13	14	14.3	4.2	3.9	10	6.9	0.7	0.4
CYP2E1	9.2	9.5	2.2	4.1	3	3.1	0.3	0.7
CYP3A2	17	17.4	6.6	15.9	10.1	14.6	15	58.1

Par exemple, chez l'homme les réactions de 1-N-déméthylation (théobromine) et 3-N-déméthylation (paraxanthine) sont CYP1A2 dépendantes alors que la réaction de 7-N-déméthylation générant la théophylline est catalysée par plusieurs CYP dont CYP1A2 (38,7 %), CYP2E1 (26,3 %), CYP3A4 (13,6 %) et la sous-famille des CYP2C (CYP2C8 (12,8 % et CYP2C9 (12,2 %)). De la même manière, chez l'homme la réaction d'hydroxylation est principalement catalysée par CYP3A4 (30 %) et CYP1A2 (28,7 %). Toutefois, d'autres enzymes participent à la formation de l'acide 1,3,7-triméthylurique tels que CYP2E1 (11 %), CYP2C8 (10 %) et CYP2C9 (8 %) (**Figure16**) (Kot & Daniel 2008b).

Par ailleurs, chez le rat, d'autres familles de CYP sont impliquées dans le métabolisme de la caféine. Par exemple, la réaction d'hydroxylation menant à l'acide 1,3,7-triméthylurique est catalysée par les CYP1A2 (70 %) et CYP3A2 (15 %) mais également d'autres CYP tels que CYP2B1 et CYP2E1. La réaction de 1-N-déméthylation est principalement catalysée par les enzymes CYP1A2 (37,5%), CYP3A2 (17 %) mais également les enzymes de la sous-famille CYP2C telles que: CYP2C11 (6 %) et CYP2C13 (14 %). La réaction de 3-N-déméthylation est principalement catalysée par les CYP1A2 (47 %) et CYP2C11 (31 %). Enfin la réaction de 7-N-déméthylation menant à la formation de la théophylline est catalysée principalement par la sous-famille des CYP2C (66 %) dont CYP2C6 (27 %), CYP2C11 (29 %) et CYP2C13 (10 %) (Kot & Daniel 2007).

Le métabolisme de la caféine est assuré par une multitude de CYP dont l'expression et la capacité catalytique sont modulées par la concentration en caféine. En effet, plusieurs études ont mis en évidence qu'à forte concentration de caféine, les proportions produites de métabolites pour certaines enzymes sont modifiées suggérant une modification de l'expression transcriptionnelle des enzymes. Par exemple, chez l'homme, l'activité de CYP1A2 (28,7 % à 16 %) est diminuée en faveur des enzymes de la sous-famille de CYP2C: CYP2C8 (10 % à 17 %) pour la réaction d'hydroxylation (Kot & Daniel 2008b) (**Tableau 3**).

La même observation a été faite chez le rat. Par exemple, lors de la réaction de 7-N-déméthylation, l'activité de CYP1A2 (14 % à 5 %) diminue en faveur du CYP2C11 (29 % à 41 %) (Kot & Daniel 2007, 2008c) (**Tableau 3**).

Chapitre 4: Métabolisme de la caféine

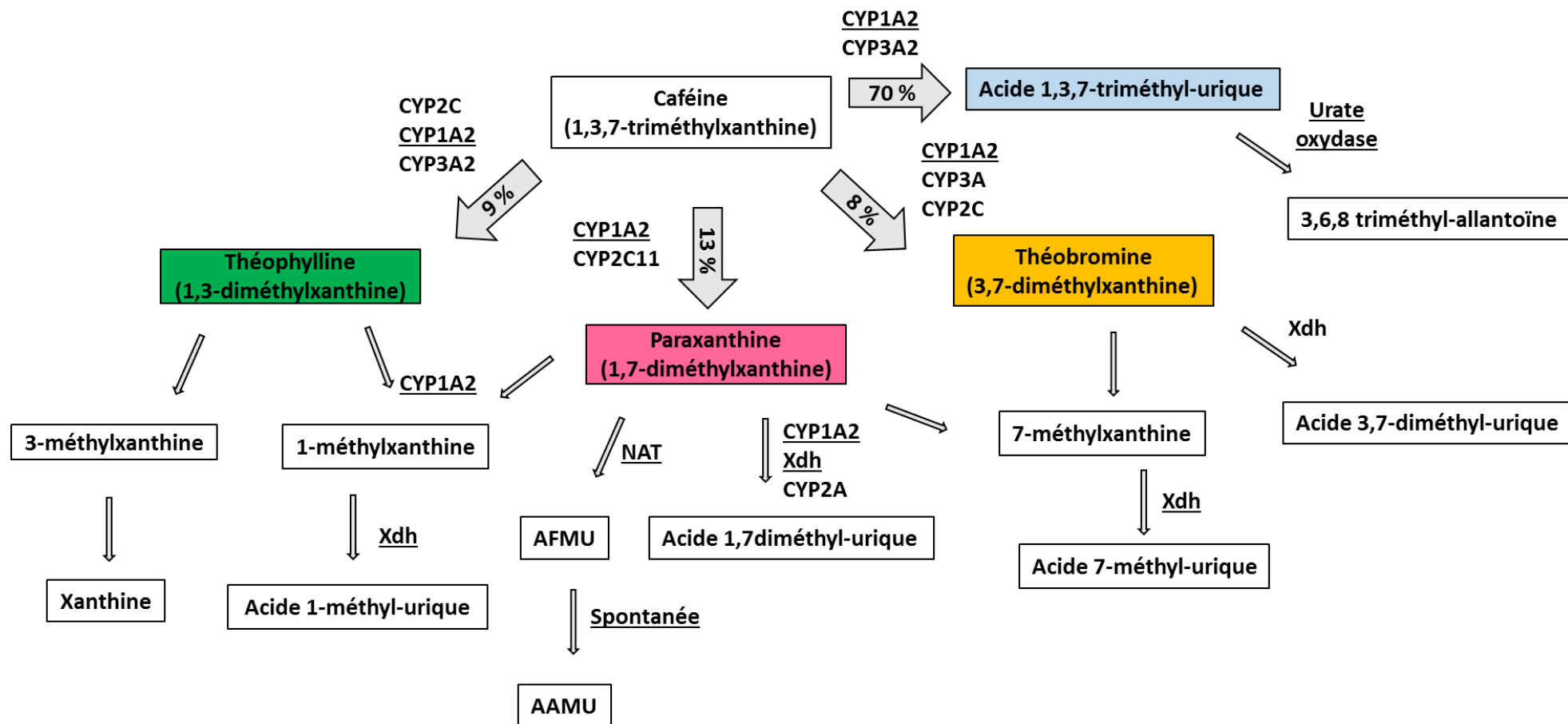


Figure 17: Voies de dégradation de la caféine chez les mammifères.

Chez les mammifères, le métabolisme hépatique de la caféine est principalement assuré par les CYP et conduit à la formation de 4 métabolites principaux: la théobromine, la paraxanthine et la théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique respectivement générés par 3 réactions de déméthylation et par une réaction d'hydroxylation. Par la suite, les métabolites principaux sont eux-mêmes dégradés afin d'être éliminés hors de l'organisme. Les enzymes communes impliquées dans la dégradation de la caféine entre l'Homme et le rat sont soulignées. Adapté à partir de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map01100.html>.

Résultats: Étude transcriptomique

Les métabolites principaux sont également transformés afin d'être éliminés hors de l'organisme. Les enzymes responsables de la dégradation des métabolites n'ont pas toutes été identifiées. Toutefois, il semblerait que les CYP soient impliquées. On dénombre au moins 15 métabolites issus de la dégradation de la caféine que l'on retrouve à la fois chez l'Homme et chez le rat (**Figure 17**).

Les CYP sont des enzymes chevauchantes dont l'expression transcriptionnelle est modulée par la concentration en substrat. Bien que le métabolisme de la caféine ne soit pas identifié chez les insectes, plusieurs études chez *Drosophila melanogaster* ont montré qu'une exposition à la caféine entraînait une modification du niveau transcriptionnel de certains CYP tels que *CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6w1*, *CYP6d5*, *CYP6a2* ainsi que d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques suggérant que les enzymes dont l'expression est modulée par le substrat pourraient intervenir dans sa dégradation (Bhaskara *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006).

Bien que la caféine soit principalement utilisée pour ces vertus psychostimulantes, il s'avère que cet alcaloïde joue un rôle prépondérant dans les interactions plantes-prédateurs au sens large (insectes herbivore ou pollinisateur) et dans les interactions plantes-plantes. Les propriétés toxiques de la caféine sont utilisées principalement par les plantes en tant que barrière de défense naturelle envers les insectes mais également les plantes environnantes. De plus, il semblerait que les plantes utilisent les molécules répulsives mais neuro-stimulantes dans leur nectar pour s'assurer de la fidélité des pollinisateurs et une reproduction réussie. La caféine a de multiple effet sur la locomotion, le sommeil mais également l'apprentissage et la mémoire que l'on retrouve à la fois chez les mammifères et les invertébrés.

A ce jour, l'intérêt de la caféine va bien au-delà de ces vertus stimulantes pour notre réveil quotidien, la caféine est une molécule naturelle d'intérêt thérapeutique impliquée dans la protection du système nerveux central des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et Alzheimer mais également des maladies liées à l'âge ainsi que la démence (Mustard 2014).

Objectifs et Stratégie

Chapitre 5: Objectifs et Stratégie

Les objectifs principaux de mon projet de thèse étaient:

- d'une part, d'identifier, de localiser et d'étudier le rôle potentiel des CYP dans la perception chimiosensorielle de la caféine.
- en parallèle, de caractériser le métabolisme de la caféine et d'identifier des CYP responsables de ce métabolisme chez *Drosophila melanogaster*.

Afin d'atteindre ces objectifs, ma stratégie s'est articulée en deux axes distincts: une approche chimiosensorielle et une approche métabolique.

5.1- Approche chimiosensorielle

Le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP chez le mammifère et les EMX sont généralement inductibles par les composés qu'elles métabolisent. Nous avons donc choisi de tirer parti de ce mécanisme pour identifier les EMX potentiellement impliqués dans le métabolisme de la caféine. Pour cela, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur des drosophiles préalablement exposées à la caféine. Par la suite, nous nous sommes principalement intéressés aux enzymes dites de phase I: les CYP dont l'expression était la plus fortement augmentée par l'exposition à la caféine dans les organes sensoriels et le corps.

Les conséquences de la diminution de l'expression de certains CYP sur la détection et la perception sensorielle de la caféine ont été évaluées en utilisant un test comportemental de gustation à choix multiple: le MultiCAFE. A l'issue de ces tests, un seul CYP candidat a été retenu pour la suite de l'étude chimiosensorielle. Puis les patrons d'expression tissulaire et cellulaire de ce CYP ont été réalisés grâce aux techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie sur proboscis *in toto*.

5.2- Approche métabolique

Chez les mammifères, la caféine est principalement biotransformée par CYP1A2 en 4 métabolites majoritaires : la théobromine, la paraxanthine, la théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique. Actuellement, le métabolisme de la caféine chez les insectes reste peu connu et très peu étudié.

A travers cette étude, nous nous sommes attachés dans un premier temps à caractériser le métabolisme de la caféine chez la drosophile puis à déterminer si les CYP identifiés par l'étude transcriptomique participaient à ce métabolisme.

Ce travail sera valorisé par deux publications :

La première publication permettra de valoriser l'aspect métabolisme de ce travail, elle est intitulée **Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*** et soumise dans la revue *PloS One*.

La partie chimiosensorielle fera l'objet d'une seconde publication intitulée **CYP6d5 implication in caffeine sensory perception**, actuellement en préparation.

Résultats

Chapitre 6: Résultats

Partie 1- Identification d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) dans les organes sensoriels et le corps dont l'expression est modulée par une exposition à la caféine

1- Étude transcriptomique (Agilent Microarray)

L'objectif de cette première étape visait à identifier des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) et plus particulièrement des CYP, exprimés dans les appendices sensoriels et dans le corps des drosophiles mâles adultes et dont l'expression génique est modulée par une exposition à la caféine.

1.1- Expression dans les appendices sensoriels

21244 sondes ont été hybridées sur les ARN de trois réplicats biologiques correspondants aux appendices sensoriels suite à une exposition ou non à la caféine. Parmi ces sondes, des tests statistiques ont permis d'éliminer les candidats faux positifs et 3891 sondes ont été finalement retenues pour l'analyse.

Dans cette analyse, on dénombre 442 gènes dans les appendices sensoriels dont l'expression est significativement augmentée et 537 gènes dont l'expression est significativement diminuée après une exposition à la caféine.

Parmi l'ensemble des gènes dont l'expression est modulée après un traitement à la caféine, nous avons répertorié les gènes appartenant aux différentes familles impliquées dans les événements péri-récepteurs telles que les EMX, les OBP et les récepteurs sensoriels.

Parmi ces gènes, on retrouve les différentes classes d'EMX telles que les enzymes dites de phase I avec 22 gènes codant des CYP dont 18 sont sur-exprimés. On retrouve également des carboxylestérases (5 gènes) et des déshydrogénase/réductases (11 gènes).

Résultats: Étude transcriptomique

Appendices sensoriels - Traitement à la caféine											
Enzymes PHASE I						Enzymes PHASE II			Transporteurs PHASE III		
Cytochromes P450 (CYP)			Déshydrogénases/ Réductases (SDR)			Glutathione -S-transférase (GST)			ATP-binding cassette transporters		
Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value
<i>CYP12d1-d</i>	37.12	2.78E-05	<i>CG31809</i>	4.26	5.71E-04	<i>GSTD2</i>	18.91	1.08E-05	<i>MDR50</i>	10.88	1.83E-04
<i>CYP12d1-p</i>	35.07	3.17E-05	<i>CG2065</i>	4.08	5.56E-05	<i>GSTD7</i>	10.94	8.82E-05	<i>MRP</i>	2.39	9.04E-04
<i>CYP6a8</i>	7.13	1.81E-05	<i>CG31810</i>	4.03	6.40E-04	<i>GSTD5</i>	7.96	2.20E-03	<i>CG8908</i>	2.10	9.74E-04
<i>CYP6d5</i>	6.20	7.83E-06	<i>CG9360</i>	3.76	1.14E-04	<i>GSTD4</i>	3.78	5.31E-04	<i>CG33970</i>	-2.20	6.34E-03
<i>CYP4d14</i>	4.26	6.30E-04	<i>CG30495</i>	-2.06	9.51E-04	<i>GSTE1</i>	3.63	5.18E-05	Protéines de transport		
<i>CYP4d1</i>	3.84	9.47E-04	<i>CG3603</i>	-2.51	1.62E-03	<i>GSTD3</i>	2.84	1.03E-05	Odorant-binding proteins (OBP)		
<i>CYP4p1</i>	3.61	3.45E-04	<i>CG14946</i>	-2.77	1.35E-03	<i>CG9362</i>	-3.18	4.50E-04			
<i>CYP6a9</i>	3.32	4.33E-06	<i>CG6012</i>	-3.59	5.83E-04				Gènes	Régulation	P Value
<i>CYP6a22</i>	3.02	2.50E-04	<i>CG3699</i>	-4.88	1.99E-04				<i>OBP50c</i>	5.95	6.03E-03
<i>CYP4p2</i>	2.76	6.21E-04	<i>CG7322</i>	-5.00	6.09E-04				<i>OBP56f</i>	3.36	2.39E-03
<i>CYP6a20</i>	2.43	8.93E-04	<i>CG12116</i>	-11.23	6.06E-05				<i>OBP83cd</i>	-2.07	1.03E-04
<i>CYP4ac3</i>	2.41	1.11E-03	Carboxylestérases			UDP- glycosyltransférases (UGT)			<i>OBP99c</i>	-3.15	2.36E-03
<i>CYP6a20</i>	2.26	3.25E-04				Gènes	Régulation	P Value	<i>OBP83g</i>	-3.54	8.07E-04
<i>CYP304a1</i>	2.16	4.26E-04				<i>UGT86Dd</i>	5.81	1.71E-03	<i>OBP99b</i>	-5.94	1.23E-03
<i>CYP6a23</i>	2.14	4.77E-05				<i>UGT36Bb</i>	4.60	9.41E-04	Récepteurs		
<i>CYP4ac3</i>	2.12	8.60E-03	Gènes	Régulation	P Value	<i>CG10178</i>	-2.15	3.00E-03	Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)		
<i>CYP4p3</i>	2.05	6.52E-04	<i>CG31146</i>	3.34	2.71E-04	<i>CG6850</i>	-2.25	1.43E-04	Gènes	Régulation	P Value
<i>CYP6a17</i>	2.01	2.56E-04	<i>CG7529</i>	-2.16	1.98E-03	<i>CG17324</i>	-4.87	3.30E-03	<i>Galpha73B</i>	2.45	6.30E-04
<i>CYP313a1</i>	-2.15	5.77E-03	<i>Est-6</i>	-2.55	2.93E-03				<i>CG9918</i>	-3.26	1.76E-03
<i>CYP4ac1</i>	-3.31	8.82E-03	<i>alpha-Est2</i>	-2.59	3.26E-03						
<i>CYP305a1</i>	-3.72	1.40E-03	<i>CG4757</i>	-3.19	2.06E-03						
<i>CYP4ac2</i>	-4.70	3.94E-03									

Figure 18: Gènes impliqués dans les événements péri-récepteurs dont l'expression est modulée par une exposition à la caféine dans les appendices sensoriels. Les gènes dont l'expression augmente sont indiqués en rouge et ceux dont l'expression diminue sont indiqués en bleu. Cut off=+/-2, P value <0,001 (***).

Résultats: Étude transcriptomique

Des gènes codant des enzymes dites de phase II telles que les GST (7 gènes) et les UGT (5 gènes) ont également été répertoriés. Enfin, nous avons identifié des transporteurs ATP binding cassette dits de phase 3 (4 gènes), impliqués dans l'élimination des xénobiotiques biotransformés hors de la cellule. L'expression d'un récepteur et d'une protéine G a été aussi modulée par l'exposition à la caféine.

Ainsi cette étude transcriptomique a permis de mettre en évidence diverses familles de protéines impliquées dans les événements péri-récepteurs (OBP, EMX et récepteurs). L'ensemble de ces candidats pourraient être impliqués directement et/ou indirectement dans le transport, la biotransformation, l'élimination et la réception du signal après une exposition à la caféine (**Figure 18**).

Tableau 4: Tableau comparatif du niveau d'expression de gènes candidats impliqués dans les événements péri-récepteurs dans les appendices sensoriels exposés à la caféine.

L'expression d'un gène candidat est considérée comme significativement différente de la condition contrôle lorsque que la P value est inférieure à 0,05.

Gènes		Expression Appendices sensoriels			
		Microarray		RT-q-PCR	
		Régulation	P Value	Régulation	P Value
Phase I	<i>CYP12d1</i>	35.07	3.17E-05	20.1	1.00E-03
	<i>CYP6a8</i>	7.13	1.81E-05	19.9	1.00E-03
	<i>CYP6d5</i>	6.20	7.83E-06	24.5	1.00E-02
	<i>CYP4d14</i>	4.26	6.30E-04	3.2	1.00E-03
	<i>CYP4d1</i>	3.84	9.47E-04	5.7	1.00E-03
Phase II	<i>GSTD2</i>	18.91	1.08E-05	34.1	1.00E-03
	<i>GSTD7</i>	10.94	8.82E-05	9.1	1.00E-03
	<i>UGT36Bb</i>	5.81	1.71E-03	5.7	1.00E-03
	<i>UGT86Dd</i>	4.60	9.41E-04	5.8	1.00E-03
Phase III	<i>MDR50c</i>	10.88	1.83E-04	8.5	1.00E-03
	<i>MRP1</i>	2.39	9.04E-04	4	1.00E-02
Protéines de transport	<i>OBP50c</i>	5.95	6.03E-03	5.6	5.00E-02
	<i>OBP56f</i>	3.36	2.39E-03	4.8	5.00E-02

Afin de valider l'étude transcriptomique, plusieurs gènes de chaque famille (CYP, GST, UGT et OBP) ont été sélectionnés et leur niveau d'expression a été validé par PCR quantitative. On remarque que les gènes annotés comme étant sur-exprimés par l'étude transcriptomique sont également sur-exprimés par PCR quantitative. Toutefois, pour certains candidats (*CYP6a8*, *CYP6d5*) l'écart entre les niveaux d'expression peut se montrer important s'expliquant par les différentes techniques et les outils d'analyses utilisés (**Tableau 4**).

Résultats: Étude transcriptomique

Corps entiers - Traitement à la caféine														
Enzymes PHASE I						Enzymes PHASE II			Transporteurs PHASE III			Récepteurs		
Cytochromes P450			Déshydrogénases/ Réductases (SDR)			Glutathione -S-transférase (GST)			ATP-binding cassette transporters			Récepteurs gustatifs		
Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value	Gènes	Régulation	P Value
CYP12d1-p	21.41	1.32E-05	CG9360	6.08	5.04E-06	GSTD6	4.05	8.45E-03	CG8908	3.36	1.02E-05	Gr94a	4.24	7.52E-03
CYP12d1-d	19.56	2.92E-06	CG31809	3.21	9.99E-05	GSTE1	4.04	3.37E-04	CG4562	-2.05	2.68E-03	Gr21a	2.96	1.94E-03
CYP6a8	13.48	3.00E-04	CG2065	3.14	1.32E-04	GSTD5	3.08	6.69E-03	CG31792	-2.10	3.97E-04	Gr64d	2.20	1.06E-02
CYP6d5	3.47	1.60E-04	CG31810	2.58	9.89E-04	GSTE12	-2.09	1.14E-04	CG9664	-2.78	3.77E-04	Gr33a	2.18	1.39E-03
CYP4p1	2.96	2.60E-05	CG13833	-2.32	3.55E-04	GSTD10	-2.41	1.09E-02	CG33970	-3.05	1.08E-05	Gr59e	2.15	1.04E-03
CYP304a1	2.86	1.45E-02	CG3603	-2.34	3.79E-05	GSTE9	-2.47	1.69E-05	Protéines de transport			Récepteurs olfactifs		
CYP28a5	2.45	2.58E-04	CG13284	-2.37	5.75E-05	GSTD8	-2.85	1.78E-03	Odorant-binding proteins (OBP)			Or7a	4.15	1.85E-04
CYP12a5	2.42	1.00E-03	CG18814	-2.74	5.56E-04	GSTZ1	-3.22	1.87E-04				Or2a	2.46	3.45E-03
CYP6a9	2.39	1.50E-02	CG2070	-3.23	1.78E-03	GSTD11	-4.04	2.50E-03	Gènes	Régulation	P Value	Or71a	2.24	5.81E-03
CYP6a20	2.31	1.00E-02	CG11200	-3.37	1.36E-03	UDP- glycosyltransférases (UGT)			OBP85a	2.13	1.27E-03	Récepteurs ionotropiques		
CYP6w1	2.07	6.57E-04	CG3699	-3.70	1.43E-04				OBP57c	-2.08	3.34E-04			
CYP313a3	-2.05	2.42E-02	CG12116	-4.63	2.22E-04				OBP57b	-2.10	6.80E-04	Récepteurs couplés aux protéines G		
CYP6a18	-2.40	5.07E-04	CG7322	-5.78	2.91E-05	OBP83cd	-2.21	2.18E-03	CG7385	2.30	2.76E-02			
CYP4d8	-2.56	3.51E-04	CG6012	-8.19	5.18E-04	Carboxylestérases			OBP58b	-2.39	1.75E-02			
CYP316a1	-2.81	5.49E-04	Gènes						Régulation					
CYP4e1	-3.56	8.00E-05				Gènes						Régulation		
CYP4d20	-3.68	5.13E-04	Gènes						Régulation					
CYP313a1	-4.17	3.43E-04				Gènes						Régulation		
CYP4ac1	-4.96	4.17E-04	Gènes						Régulation					
CYP4ac2	-9.61	4.03E-04				Gènes						Régulation		
CYP4d21	-15.44	4.16E-04	Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		
			Gènes						Régulation					
						Gènes						Régulation		

Figure 19: Gènes impliqués dans les événements péri-récepteurs dont l'expression est modulée dans le corps par une exposition à la caféine. Les gènes dont l'expression augmente sont indiqués en rouge et ceux dont l'expression diminue sont indiqués en bleu. Cut off=+/-2, P value <0,001 (***).

1.2- Expression dans l'abdomen et le thorax (corps)

23401 sondes ont été hybridées sur les ARN de trois réplicats biologiques de corps entiers exposés avec ou sans caféine. Parmi ces sondes, 13108 sondes ont été retenues après analyses statistiques.

Dans cette étude, on dénombre 749 gènes dont l'expression est augmentée et 1518 gènes dont l'expression est significativement diminuée.

Nous avons identifié des EMX de phase I comme les CYP avec 21 gènes dont 11 sont sur-exprimés ainsi que des carboxylestérases (7 gènes) et des déshydrogénases/ réductases (14 gènes). Des gènes codant des EMX de phase II telles que les GST (9 gènes) et les UGT (7 gènes) ont également été répertoriés ainsi que EMX de phase 3 comme des transporteurs ATP binding cassette (5 gènes), impliqués dans l'élimination des xénobiotiques biotransformés hors de la cellule (**Figure 19**).

D'autres éléments impliqués dans les événements péri-récepteurs tels des OBP et des récepteurs sensoriels de types gustatifs, olfactifs et ionotropiques ont été identifiés.

Comme précédemment et afin de valider l'étude transcriptomique, plusieurs gènes de chaque famille ont été sélectionnés et leur niveau d'expression a été validé par PCR quantitative. Les écarts entre les niveaux d'expression peuvent se révéler important pour certains gènes tels que *CYP6d5* ou *CYP4ac2* (**Tableau 5**).

Résultats: Étude transcriptomique

Tableau 5: Tableau comparatif du niveau d'expression de gènes candidats impliqués dans les événements péri-récepteurs dans le corps après une exposition à la caféine.

L'expression d'un gène candidat est considérée comme significativement différente de la condition contrôle lorsque que la P value est inférieure à 0,05.

Gènes		Corps entiers - Traitement caféine			
		Microarray		RT-q-PCR	
		Régulation	P Value	Régulation	P Value
Phase I	<i>CYP12d1-p</i>	21.41	1.32E-05	15	1.00E-03
	<i>CYP6a8</i>	13.48	3.00E-04	20.5	1.00E-03
	<i>CYP6d5</i>	3.47	1.60E-04	11.8	1.00E-03
	<i>CYP4p1</i>	2.96	2.60E-05	2.13	1.00E-02
	<i>CYP4d14</i>	ns	ns	1.24	4.01E-01
	<i>CYP4d1</i>	ns	ns	1.29	2.59E-01
	<i>CYP304a1</i>	2.86	1.45E-02	2.1	5.00E-02
	<i>CYP12a5</i>	2.42	1.00E-03	3.52	1.00E-02
	<i>CYP6a9</i>	2.39	1.50E-02	3.9	1.00E-02
	<i>CYP6a20</i>	2.31	1.00E-02	2	1.00E-02
	<i>CYP4d20</i>	-4.21	1.61E-04	-2.3	1.00E-03
	<i>CYP313a1</i>	-4.29	4.60E-04	-5.3	1.00E-03
	<i>CYP4ac1</i>	-4.96	4.17E-04	-3.5	1.00E-03
	<i>CYP4ac2</i>	-9.61	4.03E-04	-3	1.00E-03
	<i>CYP4d21</i>	-15.44	4.16E-04	-9.8	1.00E-03
Phase II	<i>GSTD2</i>	2.02	1.20E-03	2.32	8.80E-02
	<i>GSTD7</i>	ns	ns	-1.11	7.57E-01
	<i>UGT36Bb</i>	ns	ns	1.17	4.40E-01
	<i>UGT86Dd</i>	ns	ns	2.28	5.40E-02
Phase III	<i>MDR50c</i>	ns	ns	1.16	7.44E-01
	<i>MRP1</i>	ns	ns	2.11	1.04E-01
Protéines de transport	<i>OBP50c</i>	1.57	9.58E-04	2.01	0.108
	<i>OBP56f</i>	-2.54	4.79E-04	-2.52	1.70E-02

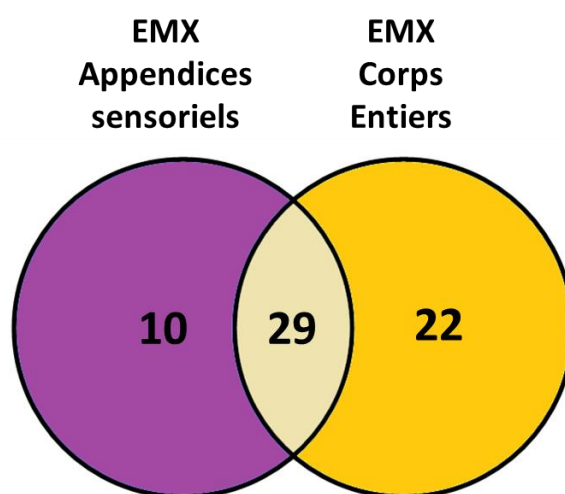


Figure 20: Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant des EMX (CYP, GST, UGT et transporteurs) dont l'expression est modulée dans les appendices sensoriels et le corps après 12 heures d'exposition à la caféine chez la drosophile mâle adulte.

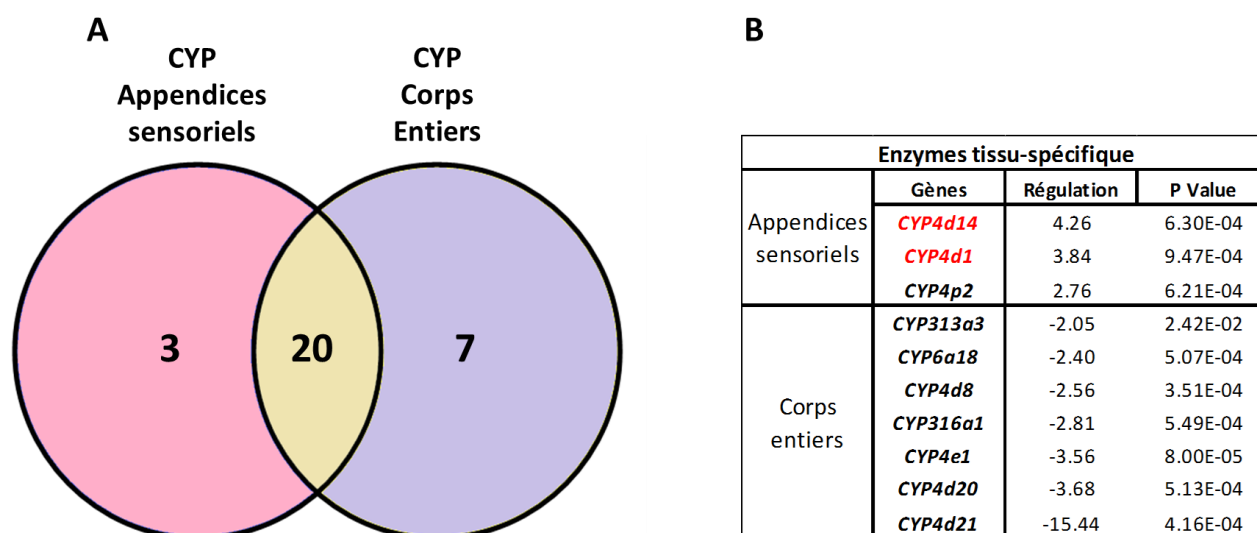


Figure 21: Comparatif des gènes codant des CYP dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.

A- Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant des CYP dont l'expression est modulée dans les appendices sensoriels et le corps. B- Tableau récapitulatif des CYP spécifiques des appendices sensoriels et du corps entier après une exposition à la caféine.

1.3- Comparaison de l'expression des EMX dans les appendices et le corps

Afin d'identifier des gènes dont l'expression pourrait être modulée spécifiquement dans les appendices sensoriels ou dans le corps, des comparaisons d'expressions ont été réalisées. Nous avons choisi de nous intéresser principalement aux EMX appartenant aux familles des CYP, des GST, des UGT et des transporteurs (**Figure 20**).

L'étude transcriptomique nous a permis d'établir que l'exposition à la caféine permet de réguler plusieurs gènes codant des EMX. Parmi, les gènes dont l'expression est régulée par la caféine, nous avons dénombré 29 gènes communs entre les deux tissus d'intérêt. Toutefois, certains gènes semblent être spécifiquement exprimés dans les organes sensoriels (10 gènes) ou dans le corps (abdomen et thorax) (22 gènes) de la drosophile mâle adulte.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus en détail aux candidats de chaque classe d'EMX que nous avons répertoriés en 3 classes: les CYP appartenant à la phase I (**Figure 21**), aux GST et UGT appartenant à la phase II (**Figure 22**) et les transporteurs appartenant à la phase III (**Figure 23**).

On remarque qu'après un traitement à la caféine, seuls les *CYP4d14*, *CYP4d1* et *CYP4p2* sont spécifiquement sur-exprimés dans les appendices sensoriels et 7 CYP sont tous sous-exprimés dans le corps. On retrouve 20 CYP dont l'expression est modulée à la fois dans les 2 types de tissus. Parmi ces gènes communs, on retrouve ceux qui présentent la plus forte induction, à savoir, *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5* (**Figure 20 et 21**).

Parmi, les EMX de phase II dont l'expression est régulée par la caféine, nous avons dénombré 7 gènes communs entre les deux tissus d'intérêt. Toutefois, certains gènes codant des GST et UGT semblent être spécifiquement exprimés dans les organes sensoriels (5 gènes) ou dans le corps (abdomen et thorax) (12 gènes) de la drosophile mâles adultes.

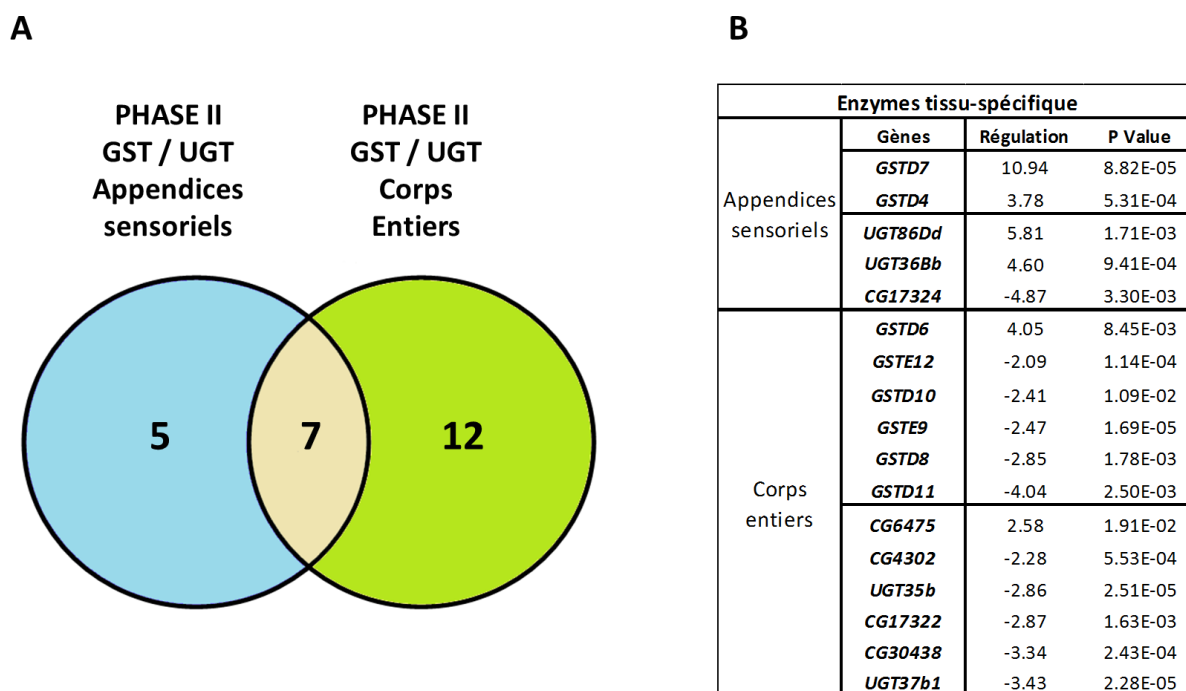


Figure 22: Comparatif des gènes codant des enzymes de phase II de types Glutathionne-S-transférases (GST) et UDP-glycosyltransférases (UGT) dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.

A- Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant des GST et des UGT dont l'expression est modulée dans les appendices sensoriels et le corps, B- Tableau récapitulatif des GST et UGT spécifiques des appendices sensoriels et du corps entier suite à une exposition à la caféine.

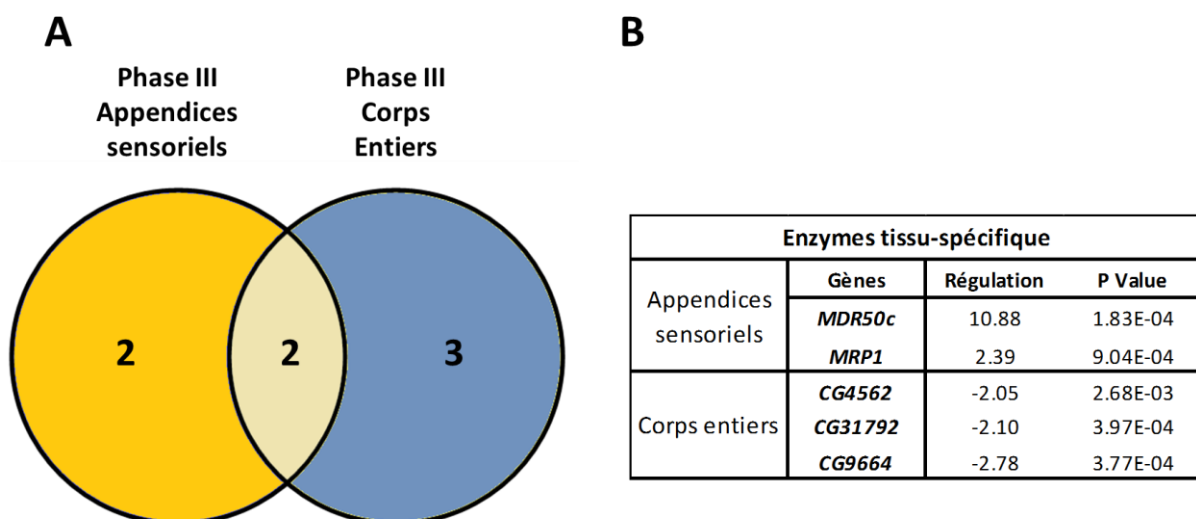


Figure 23: Comparatif des gènes codant des transporteurs de phase III dont l'expression est modulée par la caféine dans les appendices sensoriels et le corps.

A- Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes codant des transporteurs dont l'expression est modulée dans les appendices sensoriels et le corps, B- Tableau récapitulatif des transporteurs de phase III spécifiques des appendices sensoriels et du corps entier après l'exposition à la caféine.

On constate que la majorité des EMX de phase II spécifiquement exprimées dans les organes sensoriels tels que *GSTD2*, *GSTD5*, *UGT36Bb* et *UGT86Dd* ont une expression fortement augmentée suite à l'exposition à la caféine, à l'exception de l'*UGT CG17324* qui est diminuée. En revanche, les EMX de phase II, spécifiquement exprimées dans le corps ont un profil de régulation différent. En effet, l'ensemble des GST et UGT sont sous-exprimées après l'exposition à la caféine sauf *GSTD6* et l'*UGT CG6475* (**Figure 22**).

De la même manière, parmi, les transporteurs de phase III dont l'expression est régulée par la caféine, on a dénombré 2 gènes communs entre les deux tissus d'intérêt. Toutefois, on remarque que l'expression des 2 transporteurs, spécifiquement exprimés dans les organes sensoriels, est fortement induite par l'exposition à la caféine notamment pour le transporteur *MDR50c* (facteur d'induction d'environ 11 fois). De plus, on remarque que les trois gènes codant des transporteurs, spécifiquement exprimés dans le corps (abdomen et thorax) sont tous sous-exprimés après exposition à la caféine (**Figure 23**).

Conclusion

Grâce à cette étude transcriptomique, nous avons mis en évidence plusieurs nouveaux gènes candidats codant des EMX dont l'expression est régulée dans les appendices sensoriels et le corps après une exposition à la caféine. Parmi eux, nous avons retrouvé des gènes déjà répertoriés dans la littérature (*CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5*) ainsi que *CYP4d14* et *CYP4d1* qui sont spécifiquement exprimés dans les appendices sensoriels.

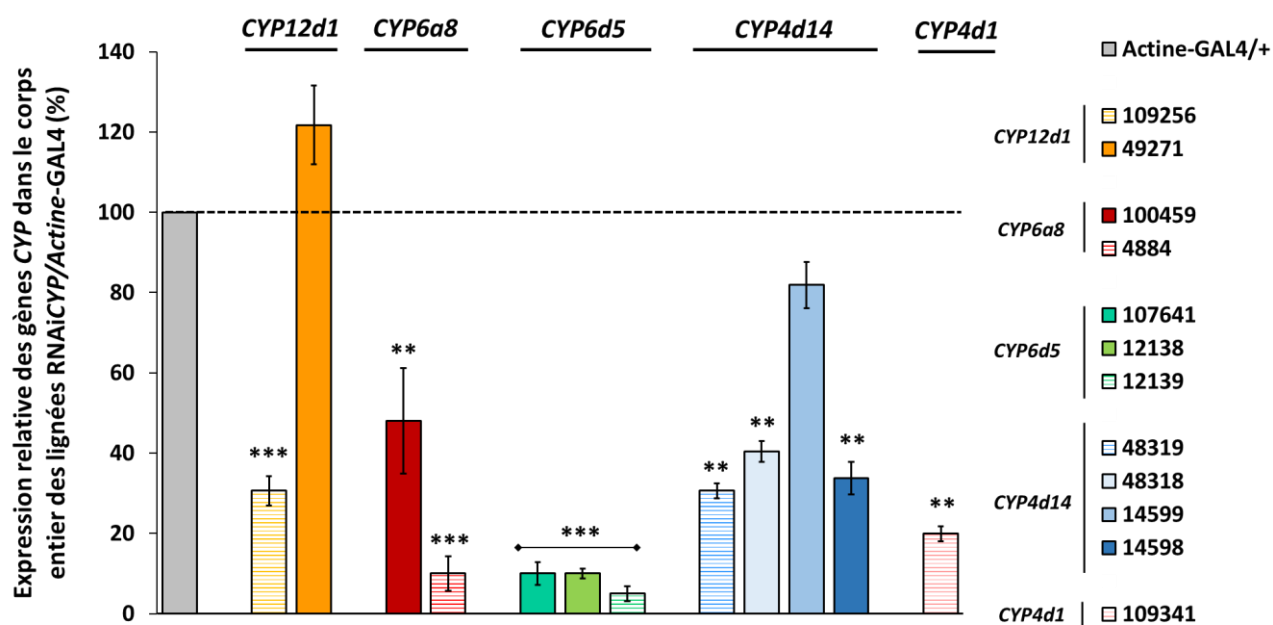


Figure 24: Modulation du niveau d'expression de l'expression des gènes *CYP* candidats (*CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6d5*, *CYP4d14* et *CYP4d1*) dans le corps entiers des individus RNAiCYP/Actine-GAL4.

Le niveau d'expression de chaque gène candidat au sein des lignées transgéniques RNAiCYP/Actine-GAL4 est comparé avec leur expression basale (100 %) au sein de la lignée contrôle Actine-GAL4/+. Les différences significative d'expression des gènes *CYP* candidats au sein des lignées RNAiCYP/Actine-GAL4 sont déterminées avec le logiciel d'analyse REST (n=3 ; *** P value < 0.0001). Pour chaque gène candidat, les hachures indiquent la lignée sectionnée.

Partie 2- Approche chimiosensorielle: rôle des Cytochromes P450 dans la perception sensorielle de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

2- Analyse des conséquences de la diminution de l'expression des CYP candidats par ARN interférent sur la perception de la caféine

Afin d'étudier les conséquences de la perturbation de l'expression des CYP sur la capacité des individus à percevoir la caféine, nous nous sommes procurés des lignées ARN interférents correspondant aux candidats les plus fortement induits par la caféine: ***CYP12d1***, ***CYP6a8***, ***CYP6d5***, et deux autres candidats spécifiques des appendices sensoriels ***CYP4d1*** et ***CYP4d14***.

La diminution de l'expression des CYP a été dirigée spécifiquement dans les organes et/ou les cellules sensorielles grâce à la technique d'ARN interférent (RNAi) combinée au système UAS/GAL4.

2.1- Sélection des lignées RNAiCYP

Nous avons obtenu plusieurs lignées transgéniques pour chaque CYP candidat (***CYP12d1***, ***CYP6a8***, ***CYP6d5***, ***CYP4d1*** et ***CYP4d14***). Afin de sélectionner la lignée la plus efficace pour chaque gène, chaque lignée RNAiCYP a été croisée avec la lignée pilote *Actine*-GAL4 permettant d'induire une diminution de l'expression des CYP candidats dans l'ensemble des tissus (**Figure 24**).

La figure 24 présente l'expression relative des gènes *CYP* des différentes lignées RNAiCYP/*Actine*-GAL4 testées en comparaison avec leur expression au sein de la lignée contrôle *Actine*-GAL4/+. Nous considérons que le niveau basal de l'expression des gènes candidats au sein de la lignée contrôle *Actine*-GAL4/+ est de 100 %.

Ainsi pour chaque CYP candidat nous avons sélectionné la lignée présentant l'efficacité d'inhibition la plus importante, c'est-à-dire la lignée transgénique montrant la plus forte diminution d'expression du gène cible dans l'ensemble des cellules du corps.

Parmi l'ensemble des lignées transgéniques testées, nous avons sélectionné les lignées **109256 (*CYP12d1*)**, **4884 (*CYP6a8*)**, **12139 (*CYP6d5*)**, **48319 (*CYP4d14*)** et **109341 (*CYP4d1*)** qui se sont révélées les plus « efficaces » (**Figure 24**).

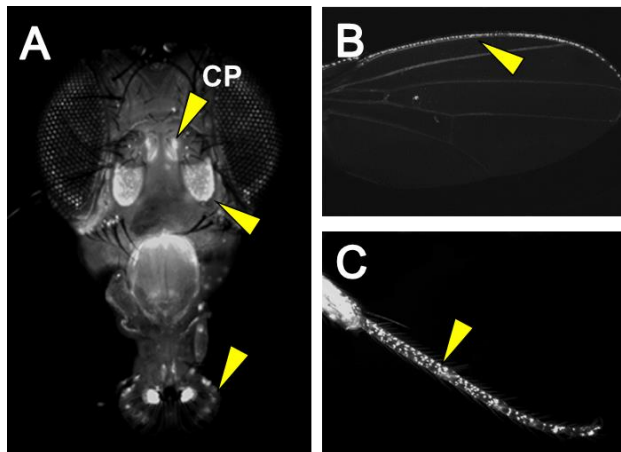


Figure 25: Profil d'expression de *Neuralized-GAL4* (*neur-GAL4*).

Le patron d'expression de cette lignée a été déterminé en croisant la lignée pilote *neur-GAL4* avec la lignée *UAS-mcd8-GFP*. La descendance issue de ce croisement exprimera la protéine GFP selon le profil d'expression de *Neuralized*.

CP: corps pédonculés.

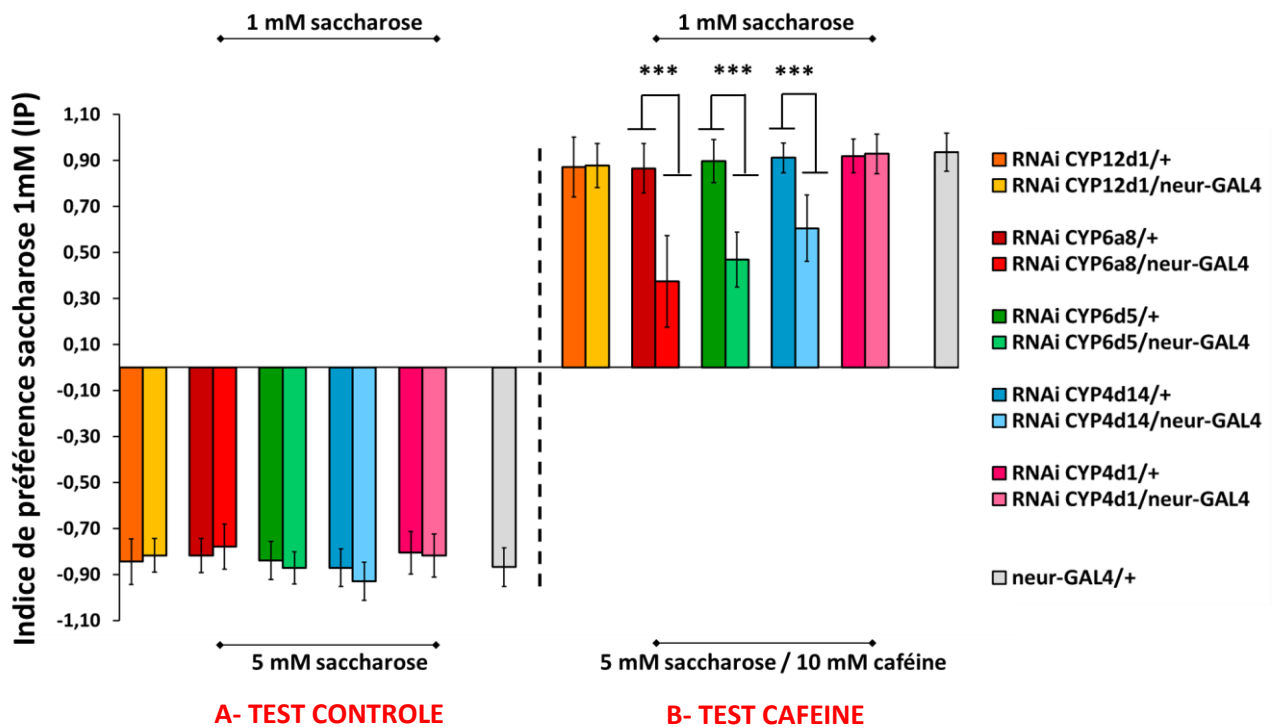


Figure 26: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées *RNAiCYP/ Neuralized-GAL4* et de leurs témoins *RNAiCYP/+* et *Neuralized-GAL4/+* pour les candidats *CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6d5*, *CYP4d14* et *CYP4d1*.

Les indices de préférence (IP) utilisés pour ces tests ont été calculés vis à vis du saccharose 1mM.

A- Test contrôle saccharose: saccharose 1mM versus saccharose 5mM.

B- Test caféine: saccharose 1mM versus saccharose (5mM) /caféine (10mM).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis nous a permis de déterminer la significativité des IP entre la lignée transgénique *RNAi CYP/ Neuralized-GAL4* et chaque lignée contrôle *RNAi CYP/+* et *Neuralized-GAL4/+* pour chacun de ces deux tests. ($n > 10$; P value: *** < 0,0001).

Afin d'étudier la fonction des EMX dans la perception chimiosensorielle, nous avons analysé les conséquences de la diminution ciblée de l'expression des CYP sensoriels sur la détection de la caféine grâce au test comportemental MultiCAFE.

2.2- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans l'ensemble des neurones sensoriels

Dans un premier temps, nous avons ciblé l'inhibition de l'expression des CYP candidats dans l'ensemble des neurones sensoriels avec la lignée *Neuralized-GAL4* (*neur-GAL4*). Comme nous l'avons montré, cette lignée présente un profil d'expression au niveau des neurones du système nerveux périphérique (les antennes, le proboscis (**Figure 25A**), la marge de l'aile (**Figure 25B**) et les pattes (**Figure 25C**) mais aussi au niveau système nerveux central, dans les corps pédonculés (CP) (**Figure 25A**).

Afin de valider les facultés des lignées transgéniques et contrôles à discriminer une concentration de 1mM et 5mM de saccharose, des tests contrôles ont été réalisés. A l'issu de ces tests, les individus mâles de toutes les lignées montrent une forte préférence pour le saccharose 5mM (**Figure 26A**). Comme toutes les lignées discriminent correctement les deux concentrations de saccharose, leur faculté à percevoir la caféine a été testée.

Ainsi, lorsque les lignées *RNAiCYP/ neur-GAL4* et leurs témoins (*RNAiCYP/+* et *neur-GAL4/+*) ont à leur disposition du saccharose 1mM et un mélange saccharose (5mM)/caféine (10mM), seules les lignées transgéniques *RNAiCYP/ neur-GAL4* pour les candidats ***CYP6a8***, ***CYP6d5*** et ***CYP4d14*** présentent un indice de préférence (IP) pour le saccharose 1mM significativement plus faible que celui de leurs deux lignées témoins respectives *RNAiCYP/+* et *neur-GAL4/+* (**Figure 26B**).

L'efficacité des transgènes RNAi pilotés par *neur-GAL4* a été contrôlée en parallèle en mesurant par RT-q-PCR le niveau d'expression des gènes candidats dans les organes sensoriels d'individus mâles.

Résultats: Approche chimiosensorielle

Génotypes	Gènes	Régulation	P value	Expression gènes cibles (%)
RNAi <i>CYP12d1</i> / <i>neur-GAL4</i>	<i>CYP12d1</i>	- 3.25	1.00E-1	20 %
RNAi <i>CYP6a8</i> / <i>neur-GAL4</i>	<i>CYP6a8</i>	- 4.90	7.00E-3	20 %
RNAi <i>CYP6d5</i> / <i>neur-GAL4</i>	<i>CYP6d5</i>	- 5.33	1.00E-3	20 %
RNAi <i>CYP4d14</i> / <i>neur-GAL4</i>	<i>CYP4d14</i>	- 2.00	1.00E-3	59 %
RNAi <i>CYP4d1</i> / <i>neur-GAL4</i>	<i>CYP4d1</i>	- 1.32	0.201	100 %

Figure 27: Modulation du niveau d'expression des CYP dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAiCYP/Neuralized-GAL4.

Le niveau d'expression basal des *CYP* dans les appendices sensoriels des individus mâles contrôle *neur-GAL4/+* est situé à 100 %. Les différences significative d'expression des *CYP* candidats au sein des lignées RNAi *CYP/neur-GAL4* sont déterminées avec le logiciel d'analyse REST (n=3 ; P value: ***< 0.0001).

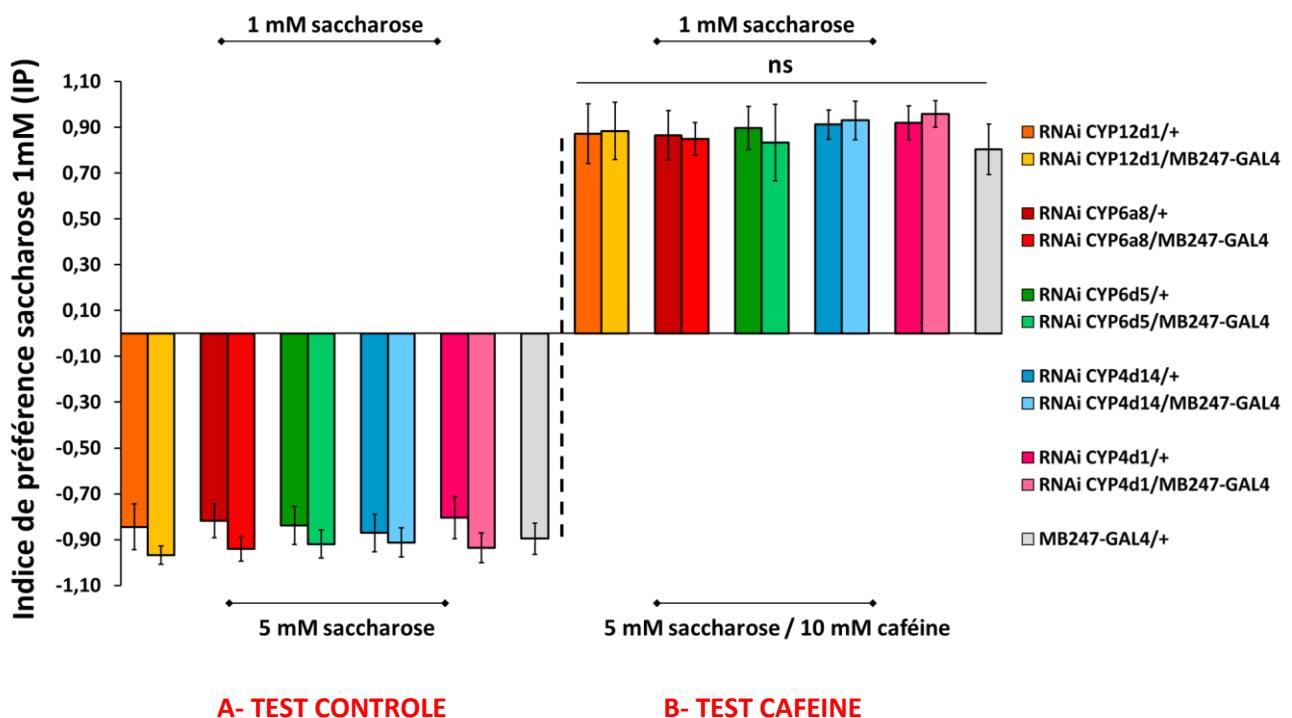


Figure 28: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées RNAiCYP/ MB247-GAL4 et de leurs témoins RNAiCYP/+ et MB247-GAL4/+.

Les indices de préférence (IP) utilisés pour ces tests ont été calculés vis à vis du saccharose 1 mM. A- Test contrôle saccharose: saccharose 1mM versus saccharose 5mM.

B- Test caféine: saccharose 1mM versus saccharose (5mM) /caféine (10mM). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis nous a permis de déterminer la significativité des IP entre les lignées transgéniques RNAiCYP/ MB247-GAL4 et chaque lignée contrôle RNAiCYP/+ et MB247-GAL4/+ pour chacun de ces deux tests. (n > 10 ; ns : non significatif).

Ainsi, dans les lignées RNAiCYP/*neur*-GAL4, seuls les gènes **CYP12d1**, **CYP6a8**, **CYP6d5** et **CYP4d14** présentent une diminution significative de leur niveau d'expression dans les organes sensoriels par rapport aux lignées témoins (RNAiCYP/+ et *neur*-GAL4/+) (**Figure 27**).

Par ailleurs, la consommation moyenne de saccharose 1mM n'est pas significativement différente entre les individus transgéniques RNAiCYP/*neur*-GAL4 et les individus contrôles au cours du test caféine. L'expression de l'ARN interférent n'entraîne pas de perturbation de la consommation des solutions tests.

Conclusion

Les lignées transgéniques RNAiCYP/*neur*-GAL4 pour les candidats **CYP6a8**, **CYP6d5** et **CYP4d14** ne présentent pas de préférence marquée pour le saccharose 1mM, contrairement à leurs contrôles respectifs. Ainsi, une modulation de l'expression des **CYP6a8** et **CYP6d5** et **CYP4d14** dans les neurones sensoriels semble entraîner une perturbation de la perception de la caféine.

2.3- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans les corps pédonculés (Mushroom Bodies) sur la perception de la caféine

L'observation du patron d'expression du driver *Neuralized* montre un marquage des neurones sensoriels du système chimiosensoriel périphérique mais également des neurones des corps pédonculés du système nerveux central. Afin de valider les résultats précédents, ces expériences ont dû être renouvelées avec le driver MB247 (mushroom bodies) qui permet de piloter l'expression des ARN interférents spécifiques de nos candidats dans les corps pédonculés.

Le test contrôle, montre que les individus mâles de toutes les lignées montrent une forte préférence pour le saccharose 5mM (**Figure 28A**). Au cours du test caféine, on observe que les indices de préférence vis-à-vis du saccharose 1mM ne sont pas significativement différents entre les lignées RNAiCYP/ MB247-GAL4 et les lignées témoins (RNAiCYP/+ et MB247-GAL4/+) (**Figure 28B**).

Résultats: Approche chimiosensorielle

Figure 29:
Modulation du niveau
des CYP dans les
sensoriels des
mâles adultes
MB247-GAL4.

Le niveau
CYP dans la tête
contrôles
à 100 %. Les
d'expression des
des lignées RNAiCYP/MB247-GAL4 sont déterminées avec REST (n=3 ; P value: *** < 0.0001).

Génotypes	Gènes	Régulation	P value	Expression gènes cibles (%)
RNAi CYP12d1 / MB247-GAL4	CYP12d1	+ 1.44	0.117	100 %
RNAi CYP6a8 / MB247-GAL4	CYP6a8	- 5.93	2.60E-2	17 %
RNAi CYP6d5 / MB247-GAL4	CYP6d5	- 193.74	1.00E-3	0 %
RNAi CYP4d14 / MB247-GAL4	CYP4d14	- 1.05	0.956	100 %
RNAi CYP4d1 / MB247-GAL4	CYP4d1	- 3.01	1.10E-2	33 %

Modulation du niveau
des CYP dans les
sensoriels des
mâles adultes
MB247-GAL4.

d'expression basal des
des individus mâles
MB247-GAL4 /+ est situé
différences significative
CYP candidats au sein

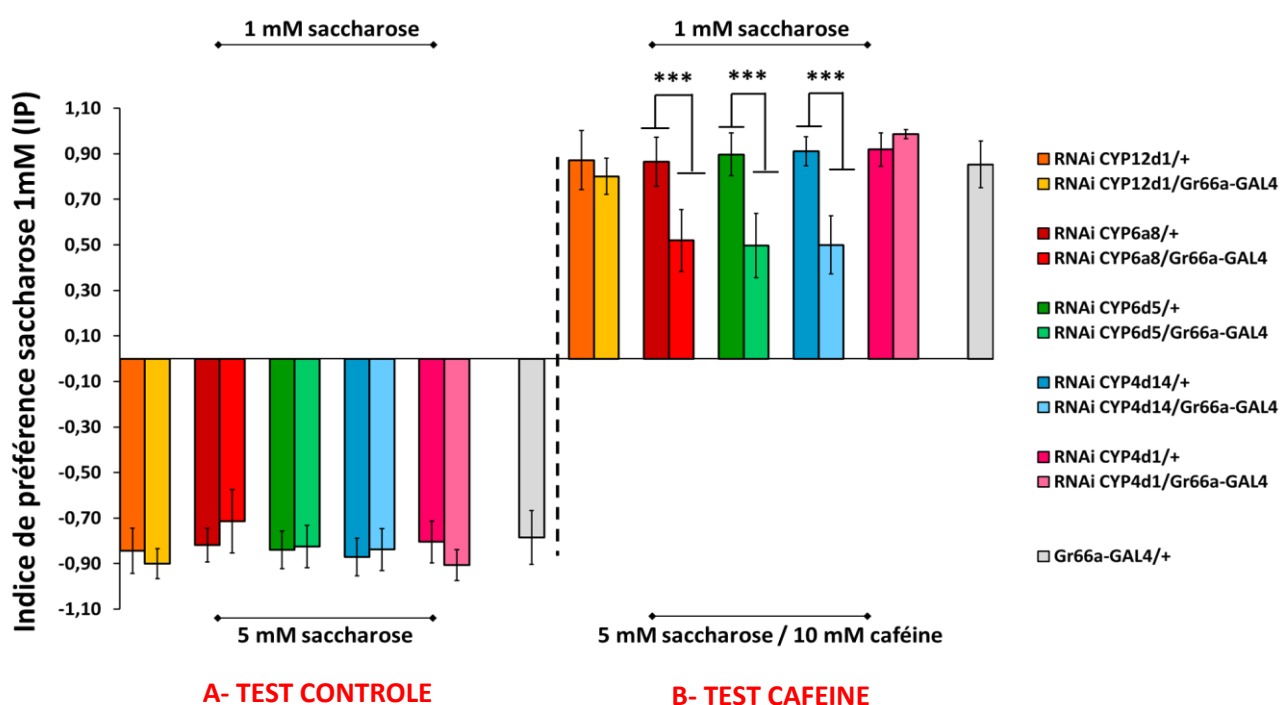


Figure 30: Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus des lignées RNAiCYP/Gr66a-GAL4 et de leurs témoins RNAiCYP/+ et Gr66a-GAL4/+.

Les indices de préférence (IP) utilisés pour ces tests ont été calculés vis à vis du saccharose 1mM.
A- Test contrôle saccharose: saccharose 1mM versus saccharose 5mM.

B- Test caféine: saccharose 1mM versus saccharose (5mM) /caféine (10mM).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis nous a permis de déterminer la significativité des IP entre les lignées transgéniques RNAiCYP/Gr66a-GAL4 et chaque lignée contrôle RNAiCYP/+ et Gr66a-GAL4/+ pour chacun de ces deux tests. (n > 10 ; P value: *** < 0,0001).

En d'autres termes, les lignées transgéniques RNAiCYP/MB247-GAL4 ainsi que les lignées contrôles présentent une préférence marquée pour le saccharose 1mM.

En parallèle, afin de vérifier l'efficacité des transgènes RNAi pilotés par MB247-GAL4, le niveau d'expression des gènes candidats a été mesuré par RT-q-PCR dans les têtes d'individus mâles. Dans les lignées RNAiCYP/MB247-GAL4, seuls les gènes *CYP6a8*, *CYP6d5* et *CYP4d1* présentent une diminution significative de leur niveau d'expression dans la tête par rapport à la lignée témoin (MB247-GAL4/+).

En revanche, les lignées transgéniques RNAiCYP12d1/MB247-GAL4 et RNAiCYP4d14/MB247-GAL4 ne présentent pas de diminution d'expression des gènes candidats cibles: *CYP12d1* et *CYP4d14* (**Figure 29**).

Conclusion

Ainsi, une modulation de l'expression des *CYP6a8*, *CYP6d5* et *CYP4d1* dans les cellules du corps pédonculé ne semble pas entraîner une perturbation de la perception de la caféine. L'ensemble des résultats obtenus avec les lignées pilotes *Neuralized*-GAL4 et MB247-GAL4 permettent d'affirmer qu'une diminution de l'expression de *CYP6a8* et *CYP6d5* dans les neurones sensoriels entraîne une perturbation de la détection de la caféine.

2.4- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression des CYP candidats dans les neurones gustatifs sensibles à la caféine Gr66a

Après avoir modulé l'inhibition des *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5* au sein de l'ensemble des neurones sensoriels, nous avons ciblé plus spécifiquement l'inhibition des CYP candidats dans les neurones gustatifs sensibles aux molécules amères exprimant le récepteur Gr66a.

A l'issu du test contrôle, on observe que les individus mâles de toutes les lignées montrent un faible indice de préférence variant de - 0,91 à - 0,71 pour le saccharose 1mM, ce qui indique une forte préférence pour le saccharose 5mM (**Figure 30A**).

Génotypes	Gènes	Régulation	P value	Expression gènes cibles (%)
RNAi <i>CYP12d1</i> / <i>Gr66a</i> -GAL4	<i>CYP12d1</i>	- 5.10	1.9E-2	19,6 %
RNAi <i>CYP6a8</i> / <i>Gr66a</i> -GAL4	<i>CYP6a8</i>	- 6,24	2.00E-3	16 %
RNAi <i>CYP6d5</i> / <i>Gr66a</i> -GAL4	<i>CYP6d5</i>	- 4,47	1.00E-3	22 %
RNAi <i>CYP4d14</i> / <i>Gr66a</i> -GAL4	<i>CYP4d14</i>	- 2.00	1.00E-3	50 %
RNAi <i>CYP4d1</i> / <i>Gr66a</i> -GAL4	<i>CYP4d1</i>	- 4.15	1.00E-3	24.5 %

Figure 31: Modulation du niveau d'expression des *CYP* dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAi*CYP*/ *Gr66a*-GAL4.

Le niveau d'expression basal des *CYP* dans les appendices sensoriels des individus mâles contrôles *Gr66a*-GAL4 /+ est situé à 100 %. Les différences significative d'expression des *CYP* candidats au sein des lignées RNAi*CYP*/ *Gr66a*-GAL4 sont déterminées avec le logiciel d'analyse REST (n=3 ; P value: ***< 0.0001).

Lorsque les lignées RNAi*CYP/Gr66a-GAL4* et leurs témoins (RNAi*CYP/+* et *Gr66a-GAL4/+*) ont à leur disposition du saccharose 1mM et un mélange contenant du saccharose (5mM)/caféine (10mM), toutes les lignées transgéniques mâles RNAi *CYP/Gr66a-GAL4* pour les candidats ***CYP6A8***, ***CYP6d5*** et ***CYP4d14*** présentent des indices de préférence (IP) pour le saccharose 1mM significativement plus faible que ceux leurs deux lignées témoins respectives RNAi*CYP/+* et *Gr66a-GAL4/+* (**Figure 30B**)

La figure 31 indique que les lignées transgéniques RNAi *CYP/Gr66a-GAL4* pour les candidats ***CYP6a8***, ***CYP6d5*** et ***CYP4d14*** ne présentent pas une préférence marquée pour le saccharose 1mM contrairement aux lignées contrôles.

De la même manière que précédemment, la consommation moyenne de saccharose 1mM a été contrôlée pour l'ensemble des lignées testées. On remarque qu'il n'y a pas de différence significative pour la consommation de saccharose entre les individus RNAi*CYP/Gr66a-GAL4* et les individus contrôles.

En parallèle, nous avons vérifié l'efficacité des transgènes RNAi pilotés par *Gr66a-GAL4*, par RT-q-PCR dans les organes sensoriels d'individus mâles. Dans les lignées RNAi *CYP/Gr66a-GAL4*, l'expression des gènes cibles *CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6d5*, *CYP4d14* et *CYP4d1* sont respectivement diminués de 80,4 %, 84 %, 78 %, 50 % et 75,5 % dans les proboscis et pattes par rapport à la lignée témoin (*Gr66a-GAL4/+*) (**Figure 31**).

Conclusion

Ces résultats indiquent qu'une modulation de l'expression des ***CYP6a8***, ***CYP6d5*** et ***CYP4d14*** dans les neurones exprimant le récepteur gustatif Gr66a entraîne une perturbation de la perception de la caféine. A la lumière de ces résultats, nous avons pu remarquer que *CYP6d5* s'est révélé être le candidat dont une diminution de l'expression dans l'ensemble des neurones sensoriels (*neur-GAL4* et *Gr66a-GAL4*) entraînait une perturbation de la détection de la caféine. C'est pourquoi, nous avons décidé de nous concentrer sur le rôle de *CYP6d5* dans la perception sensorielle de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

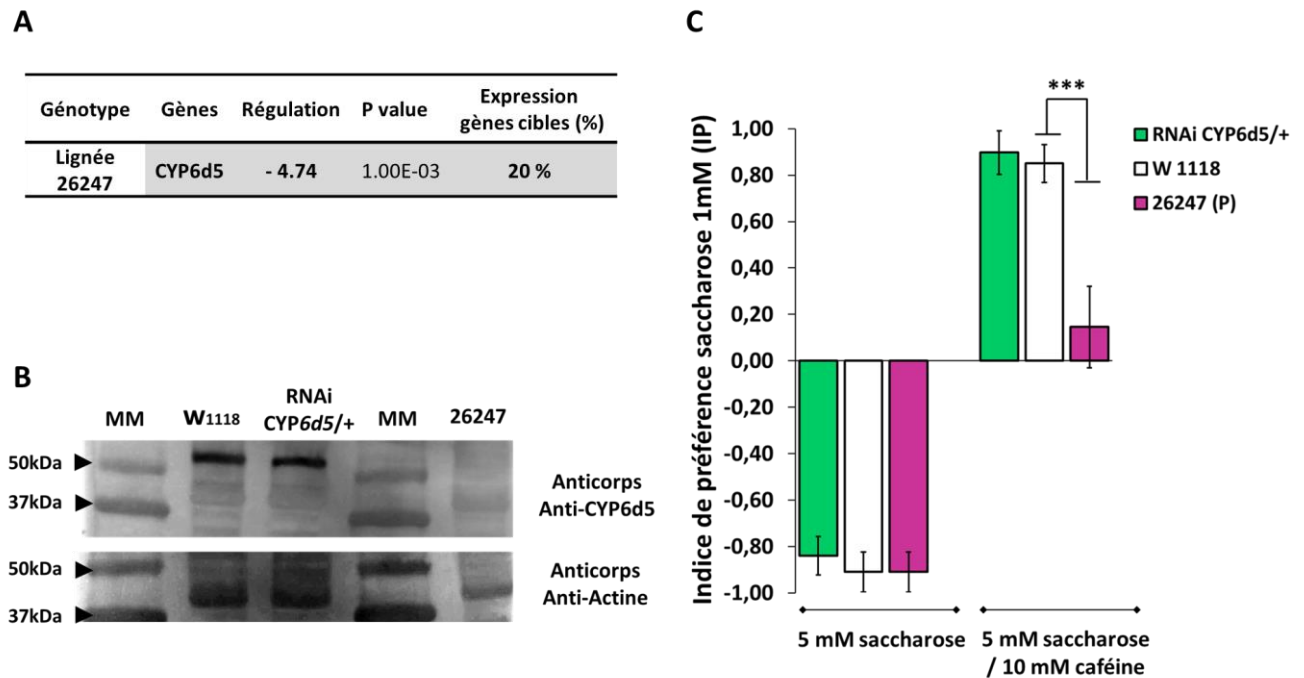


Figure 32: Implication de *CYP6d5* dans la perception de la caféine.

A- Modulation du niveau d'expression des CYP dans les organes sensoriels des individus mâles adultes 26475.

Le niveau d'expression basal de CYP6d5 dans les appendices sensoriels des individus mâles contrôles *W1118* est situé à 100 %. La différence significative d'expression de CYP6d5 au sein de la lignée 26475 sont déterminées avec le logiciel REST (n=3 ; P value: ***< 0.0001).

B- Expression de CYP6D5 par Western Blotting.

Détection de la protéine CYP6D5 dans les organes sensoriels d'individus mâles adultes 26475, RNAi *CYP6d5/+* et *W1118* avec un anticorps dirigé contre CYP6D5.

C-Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus de la lignée élément P (26475) et des témoins RNAi *CYP6d5/+* et *W1118*.

Les indices de préférence (IP) utilisés pour ces tests ont été calculés vis à vis du saccharose 1mM. A₁- Test contrôle saccharose: saccharose 1mM versus saccharose 5mM.

B₂- Test caféine: saccharose 1mM versus saccharose (5mM) /caféine (10mM).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis nous a permis de déterminer la significativité des IP entre la lignée transgénique 26475 et chaque lignée contrôle RNAi *CYP6d5/+* et *W1118* pour chacun de ces deux tests. (n > 10 ; P value: *** < 0,0001).

2.5- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la dérégulation de l'expression de CYP6d5 par un élément P

Afin de confirmer que *CYP6d5* est impliqué dans la perception sensorielle de la caféine, nous avons sélectionné une lignée (26475) présentant un élément P inséré au niveau de l'exon 2 du gène *CYP6d5* qui peut provoquer une dérégulation de l'expression de *CYP6d5*. L'effet de l'insertion de l'élément P sur la transcription de *CYP6d5* et des autres CYP a été mesuré par RT-q-PCR dans les organes sensoriels d'individus mâles. L'expression de *CYP6d5* est diminuée de 80 % dans les proboscis et les pattes. **(Figure 32A)**. Par ailleurs, l'analyse de l'expression de CYP6d5 par Western Blot dans les organes sensoriels de la lignée 26475 montre une très forte diminution de la quantité de protéine CYP6D5 en comparaison avec les individus témoins *RNAiCYP6d5/+* et *W₁₁₁₈* **(Figure 32B)**.

Ainsi, bien que la lignée P n'ait pas été caractérisée par PCR inverse, nous disposons de plusieurs arguments attestant que l'insertion de l'élément P dans le gène *CYP6d5* perturbe l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de CYP6D5 dans les appendices sensoriels.

Les capacités de perception des individus 26475 ont donc été testées grâce aux tests MultiCAFE. A l'issu des tests contrôles, les individus testés montrent un faible indice de préférence variant de - 0,91 à - 0,84 pour le saccharose 1mM, ce qui indique une forte préférence pour le saccharose 5mM **(Figure 32C-A₁)**. Lorsque la lignée mutante 26475 et les témoins (*RNAiCYP6d5/+* et *W₁₁₁₈*) ont à leur disposition du saccharose 1mM et un mélange contenant du saccharose (5mM)/caféine (10mM), la lignée mutante présente un indice de préférence (IP₂₆₄₇₅= 0,15) pour le saccharose 1mM significativement plus faible que ces deux témoins (IP_{RNAiCYP6d5/+}= 0,90 ; IP_{W₁₁₁₈}= 0,85) **(Figure 32C-B₁)**.

Ces tests indiquent donc que la lignée 26475 ne présente pas une préférence marquée pour le saccharose 1mM contrairement aux lignées contrôles. Ainsi, une dérégulation de l'expression de *CYP6d5* entraîne une perturbation de la perception de la caféine **(Figure 32C)**.

Conclusion

Une dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle de l'expression de *CYP6d5* par l'élément P provoque une perturbation de la perception de la caféine.

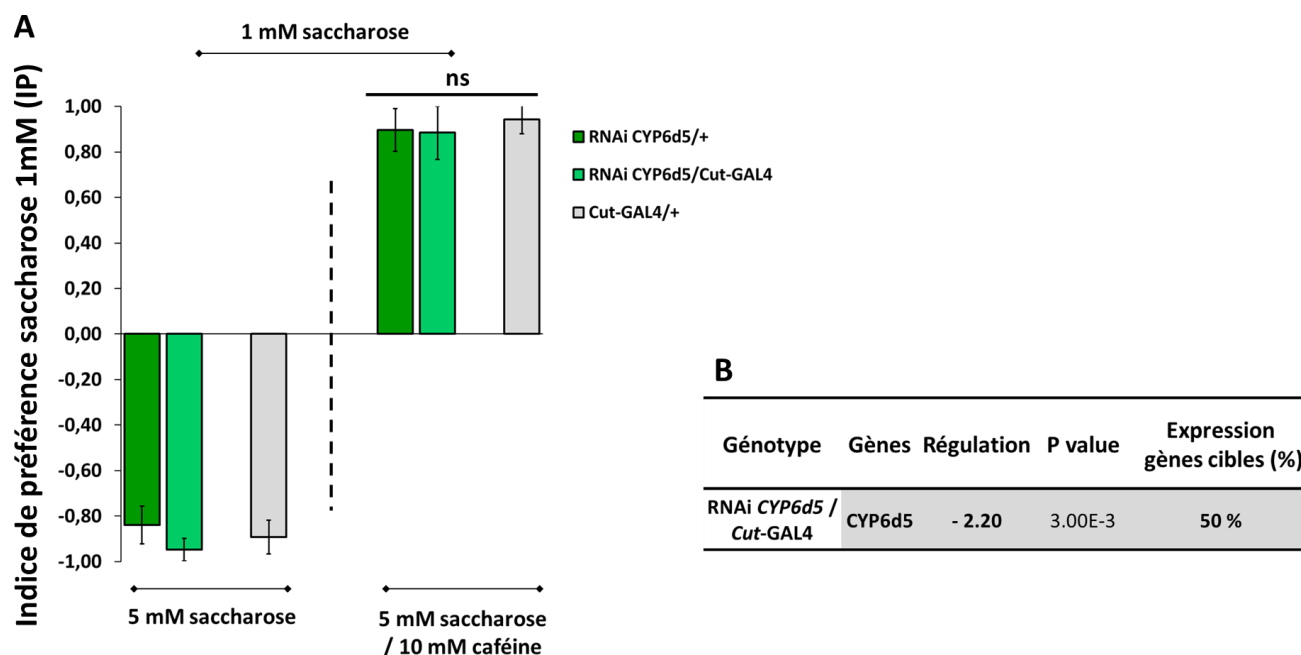


Figure 33: Influence de la diminution de l'expression de *CYP6d5* dans les cellules accessoires (Cut) dans les organes sensoriels d'individus mâles adultes.

A-Test comportemental de gustation à choix multiple: MultiCAFE réalisés sur des individus mâles issus de la lignée transgénique RNAiCYP6d5/Cut-GAL4 et des témoins RNAi CYP6d5/+ et Cut-GAL4/+.

Les indices de préférence (IP) utilisés pour ces tests ont été calculés vis à vis du saccharose 1mM. A- Test contrôle saccharose: saccharose 1mM versus saccharose 5mM.

B- Test caféine: saccharose 1mM versus saccharose (5mM) /caféine (10mM).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis nous a permis de déterminer la significativité des IP entre la lignée transgénique RNAiCYP6d5/Cut-GAL4 et chaque lignée contrôle RNAiCYP6d5/+ et Cut-GAL4/+ pour chacun de ces deux tests. (n > 10 ; P value: *** < 0,0001).

B- Modulation du niveau d'expression de *CYP6d5* dans les organes sensoriels des individus mâles adultes RNAiCYP6d5/Cut-GAL4.

Le niveau d'expression basal de *CYP6d5* dans les appendices sensoriels des individus mâles contrôles Cut-GAL4/+ est situé à 100 %. Les différences significative d'expression de *CYP6d5* au sein de la lignée RNAiCYP6d5/Cut-GAL4 sont déterminées avec le logiciel REST (n=3 ; P value: ***< 0.0001).

2.6- Analyse comportementale et moléculaire des conséquences de la modulation de l'expression de *CYP6d5* dans les cellules accessoires

Les expériences précédentes suggèrent un rôle de *CYP6d5* dans la perception de la caféine au sein des neurones sensoriels, cependant nous avons voulu savoir si une diminution ciblée de l'expression de *CYP6d5* dans les cellules accessoires entraînait une perturbation de la détection de la caféine. Pour cela, nous avons choisi le marqueur *Cut* qui sera présenté dans le chapitre.

A l'issue du test contrôle, on observe que les individus mâles de toutes les lignées montrent une forte préférence pour le saccharose 5mM (**Figure 33A**). Lorsque la préférence des lignées transgéniques *RNAiCYP6d5/Cut-GAL4* et contrôles vis à vis de la caféine est testée, la lignée *RNAiCYP6d5/Cut-GAL4* présente un indice de préférence (IP) pour le saccharose 1mM non significativement différent que ces deux témoins (**Figure 33B**).

Ces tests révèlent qu'une diminution de l'expression de *CYP6d5* dans les cellules accessoires dans lesquelles s'exprime *Cut* n'entraîne pas de perturbation de la détection de la caféine (**Figure 33**).

Comme précédemment, l'efficacité des lignées *RNAiCYP6d5/Cut-GAL4* a été testée par RT-q-PCR et démontre que l'expression de *CYP6d5* est diminuée de 50 % dans les proboscis et pattes en comparaison avec les lignées témoins (*RNAiCYP6d5/+* et *Cut-GAL4/+*) (**Figure 33B**).

Conclusion

Une diminution de l'expression de *CYP6d5* dans les cellules accessoires (*Cut-Gal4*) dans le proboscis ne semble pas provoquer une altération de la perception de la caféine. Toutefois, les données q-PCR nous indiquent que la diminution de l'expression de *CYP6d5* n'est réduite que de moitié et nous ne sommes pas certains de piloter le transgène *RNAi* dans toutes les cellules accessoires.

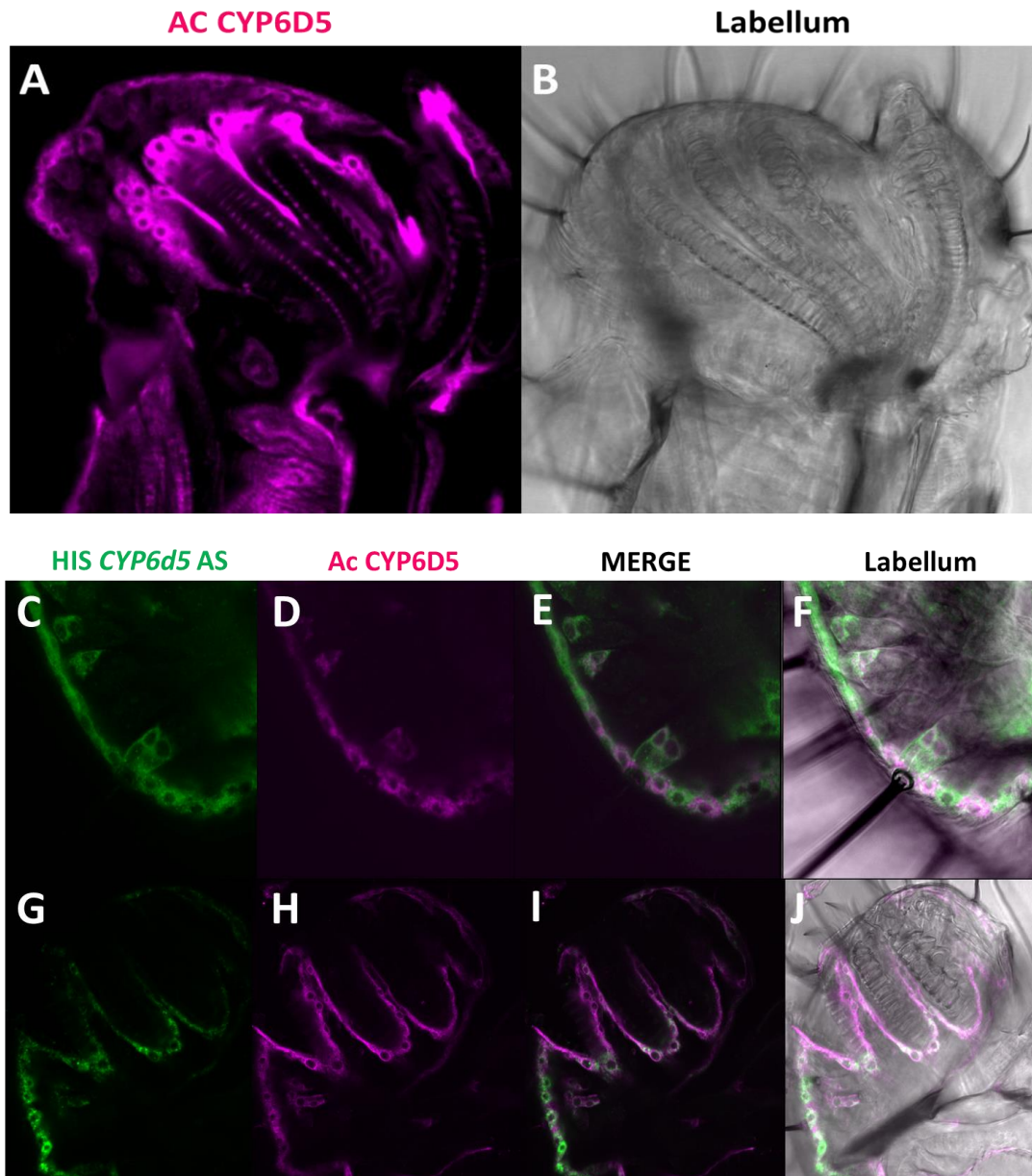


Figure 34: Profil d'expression de CYP6D5 dans le proboscis.

A- Marquage de CYP6D5 par l'anticorps dirigé contre CYP6D5 (en magenta). B-Vue latérale en lumière visible d'un labellum.

Profil d'expression des ARNm *CYP6d5* (C-F) et de la protéine CYP6D5 (D-J) au niveau des poches sensillaires et des trachées. (C & G)- Marquage des ARNm de *CYP6d5* par la sonde complémentaire (*CYP6d5* AS) par hybridation *in situ* (en vert). (D & H)- Marquage de la protéine CYP6D5 par l'anticorps dirigé contre CYP6D5 (en magenta). (E & I)- Co-marquage des ARNm de *CYP6d5* et de la protéine CYP6D5. (F & J)-Superposition du co-marquage ARNm et protéine CYP6D5 avec une vue latérale en lumière visible d'un labellum.

2.7- Distribution de CYP6D5 dans proboscis de *Drosophila melanogaster*

2.7.1- Profil d'expression de CYP6D5

Le profil d'expression et la localisation cellulaire de CYP6D5 a été étudié en utilisant des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. CYP6D5 s'exprime au niveau des cellules de l'épiderme mais également dans la structure située à la base des sensilles qui correspond aux poches sensillaires du proboscis qui abritent 3 types de cellules accessoires (thormogènes, techogènes et tricogènes) et des neurones sensoriels. **(Figures 34 C-F)**. Par ailleurs, on remarque également dans la région la plus proximale du proboscis, un marquage correspondant aux trachées **(Figure 34 G-J)**. Ces deux techniques révèlent des patrons d'expression similaires dans le proboscis et aucun signal n'est détecté ni avec la sonde sens **(Figure 35A)** ni avec le sérum pré-immun ou l'anticorps secondaire seul **(Figure 35B)**.

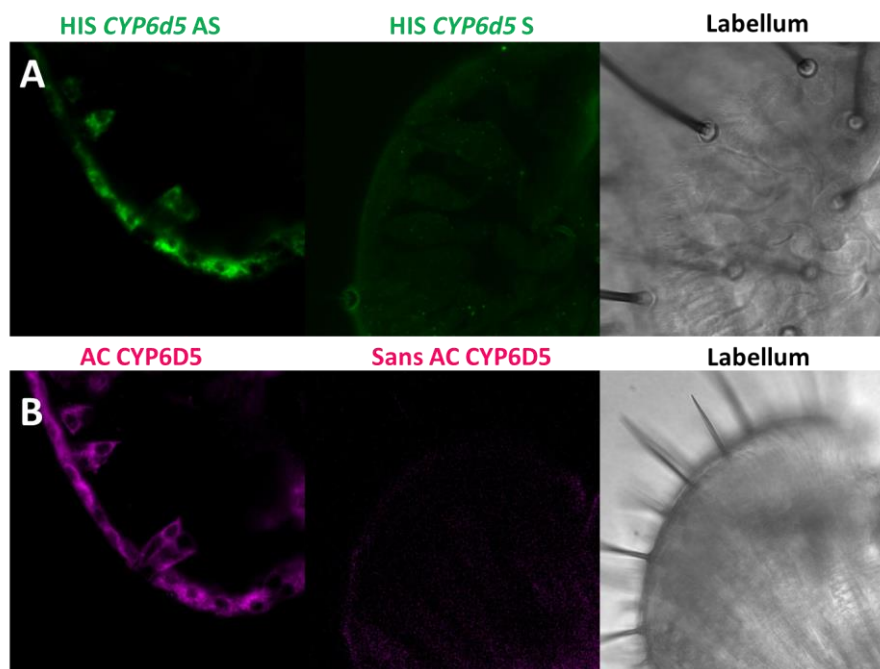


Figure 35: Expression de CYP6d5 sur proboscis *in toto* de drosophiles mâles exposés à la caféine pendant 12 heures.

A-Profil d'expression des ARNm de *CYP6d5* dans un proboscis marqué par la sonde complémentaire *CYP6d5* marquée à la digoxigénine (*CYP6d5 AS*). B- Sonde non complémentaire *CYP6d5* marquée à la digoxigénine (*CYP6d5 S*). C- Vue latérale en lumière visible du labellum de proboscis vu en B.

D- Profil d'expression de la protéine CYP6D5 dans un proboscis *in toto*. E- Immunohistochimie: Contrôle négatif CYP6D5 sur proboscis *in toto*. F- Vue latérale en lumière visible d'un labellum de proboscis vu en E.

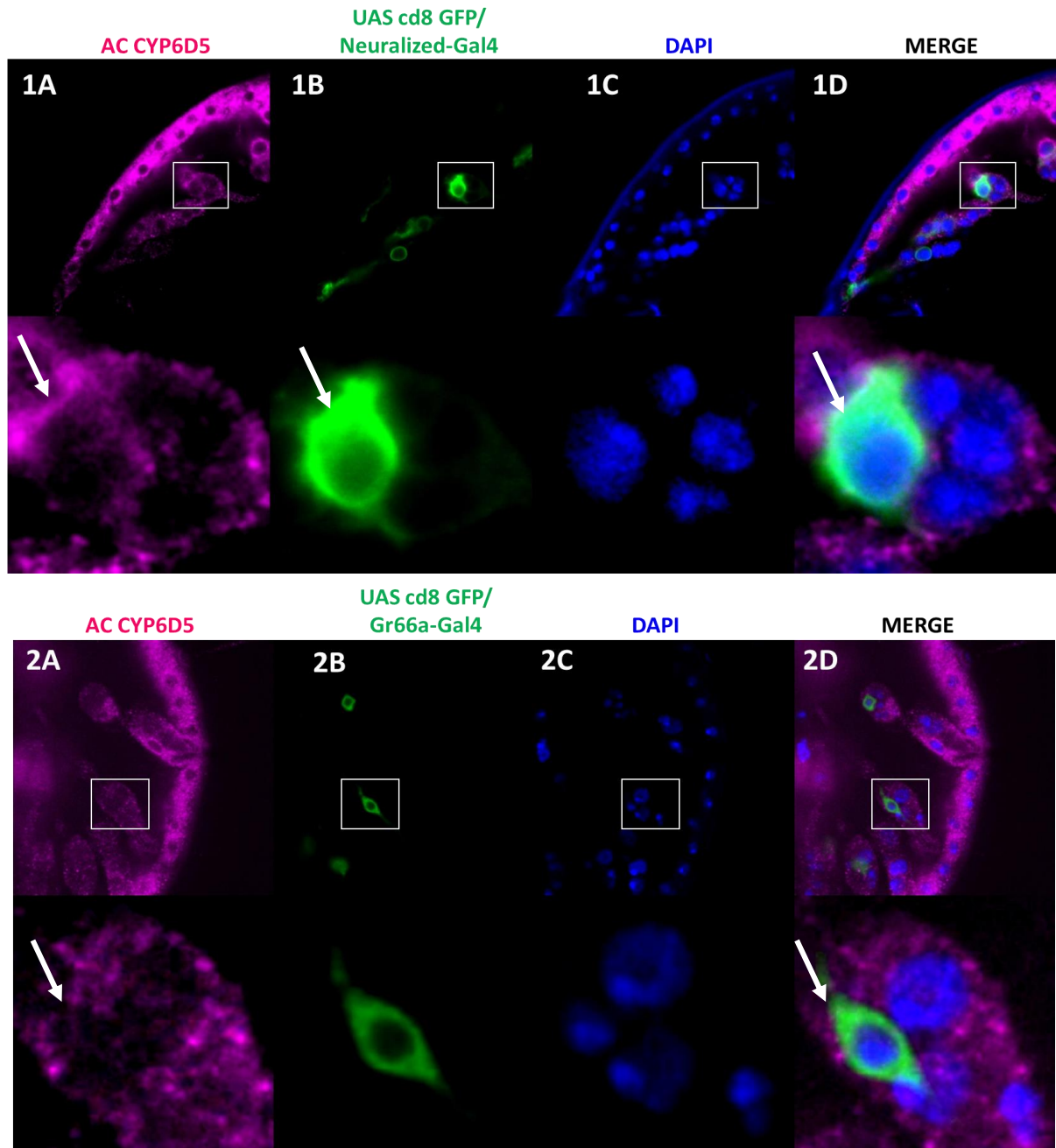


Figure 36: Profil d'expression de la protéine CYP6D5 dans les neurones sensoriels au niveau des poches sensillaires du proboscis de drosophile mâle exposés à la caféine.

Marquage de CYP6D5 et des neurones marqués par (1) Neuralized et (2) Gr66a.

A-Marquage de la protéine CYP6D5 dans les poches sensillaires du proboscis par immunohistochimie (en magenta).

B- Marquage des protéines (1) Neuralized et (2) Gr66a dans la membrane plasmique des neurones dans les poches sensillaires par immunohistochimie (en vert).

C- Marquage des noyaux des cellules au DAPI. D- Superposition des marquages CYP6D5 et (1) Neuralized et (2) Gr66a dans les poches sensillaires du proboscis. Des flèches blanches indiquent un éventuel co-marquage.

2.7.2- Localisation cellulaire de CYP6D5 dans le proboscis

Afin d'identifier le ou les types cellulaires exprimant CYP6D5, nous avons réalisé plusieurs co-marquages entre CYP6d5 et des marqueurs des neurones et des cellules accessoires.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser le système UAS-mCD8-GFP / GAL4 afin de marquer deux populations de neurones sensoriels: **Neuralized**, un marqueur général des neurones sensoriels et **Gr66a**, un marqueur spécifique des neurones chimiosensoriels portant les récepteurs gustatifs impliqués dans la détection de la caféine.

Dans un second temps, nous avons tenté de sélectionner un marqueur des cellules accessoires mais à ce jour aucun marqueur spécifique de ce type cellulaire n'a été décrit dans le proboscis.

Nous avons donc décidé d'utiliser le marqueur **Cut** qui s'exprime dans l'ensemble des cellules accessoires (thormogène, techogène et tricogène) dans l'aile de drosophile (Van De Bor & Giangrande 2001).

2.7.2.1- Expression de CYP6D5 dans les neurones sensoriels du proboscis

Afin d'identifier les cellules neuronales, des lignées GAL4 combinées à des lignées UAS GFP permettant d'exprimer un signal au niveau des membranes plasmiques ont été d'utilisées.

Les résultats obtenus avec ces différents marqueurs neuronaux sont résumés dans la figure 36. L'analyse du signal obtenu avec l'anticorps anti-CYP6D5 au sein des poches sensillaires montre un marquage très granuleux et diffus suggérant une expression de CYP6d5 au niveau de la membrane plasmique et/ou dans la lymphe sensillaire (**Figure 36**).

Bien que l'analyse des images ne nous permette pas d'être complètement affirmatifs, il semble que CYP6D5 co-localise avec Neuralized et GR66a.

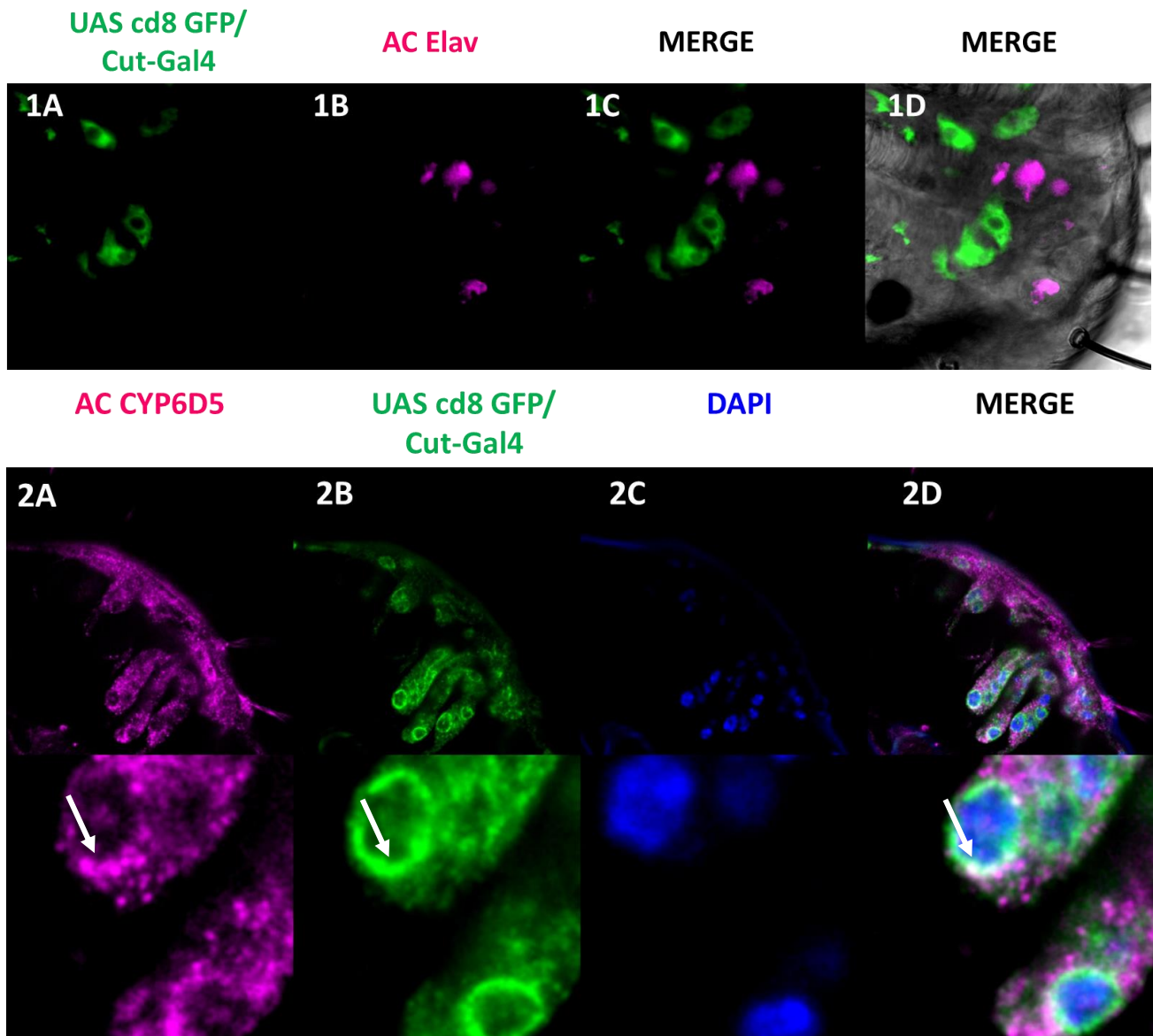


Figure 37: Profil d'expression de CYP6D5 dans les cellules accessoires au niveau des poches sensillaires du proboscis de drosophile mâle exposés à la caféine.

1A-Marquage de la membrane plasmique des cellules Cut positives dans proboscis par immunohistochimie (en vert). 1B- Marquage des noyaux des neurones sensoriels par l'anticorps dirigé contre Elav dans le proboscis par immunohistochimie (en magenta). 1C-Superposition des marquages Cut et Elav dans le proboscis. 1D- Vue latérale en lumière visible d'un labellum de proboscis.

2A-Marquage de la protéine CYP6D5 dans les poches sensillaires du proboscis par immunohistochimie (en magenta). 2B- Marquage de la membrane plasmique des cellules Cut positives dans les poches sensillaires par immunohistochimie (en vert). 2C- Marquage des noyaux des cellules au DAPI. 2D- Superposition des marquages CYP6D5 et Cut dans les poches sensillaires du proboscis. Les flèches blanches indiquent un éventuel co-marquage.

2.7.2.2- Expression de CYP6D5 dans les cellules accessoires du proboscis

Nous avons tenté de sélectionner un marqueur des cellules accessoires mais à ce jour aucun marqueur spécifique de ce type cellulaire n'a été décrit dans le proboscis.

Nous avons donc décidé d'utiliser le marqueur **Cut** qui s'exprime dans l'ensemble des cellules accessoires (thormogène, techogène et tricogène) dans l'aile de drosophile (Van De Bor & Giangrande 2001).

Afin de confirmer que Cut s'exprime dans les cellules accessoires du proboscis, nous avons réalisé un co-marquage entre Cut (via la lignée *Cut-Gal4/UAS-mCD8-GFP*) et Elav. La figure 37 1A-D montre clairement que les cellules exprimant Cut ne sont pas de nature neuronale mais des cellules accessoires (**Figure 37 1C**).

Un co-marquage entre CYP6D5 et Cut, (**Figure 37 2D**) montre clairement une co-expression de ces deux marqueurs dans les cellules accessoires. Le fait que Cut soit exprimé au niveau de la membrane plasmique et qu'il co-localise parfaitement avec CYP6D5 laisse penser fortement que ce dernier s'exprime au niveau de la membrane plasmique de ces cellules.

Conclusion

Cette étude nous a permis de mieux définir le patron d'expression de CYP6D5 au sein du proboscis où il s'exprime à la fois dans les poches sensillaires renfermant les neurones et les cellules accessoires, mais aussi dans l'épiderme et autour des trachées. Au niveau des poches sensillaires, CYP6D5 s'exprime très clairement dans les cellules accessoires alors que la colocalisation dans certains neurones est moins évidente. Par ailleurs, la colocalisation entre Cut et CYP6D5 au niveau de la membrane plasmique suggère fortement que ce dernier serait exprimé au niveau de la membrane et/ou sécrété dans la lymphe sensillaire.

Partie 3- Approche métabolique: rôle des CYP dans le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

Actuellement, malgré l'importance de cette molécule dans les relations plantes insectes et son utilisation pour étudier la régulation de l'expression des gènes chez l'insecte, le métabolisme de la caféine n'est pas caractérisé. A travers cette étude, nous nous sommes attachés à vérifier si le métabolisme de la caféine chez les insectes est dépendant des CYP et s'il existe des similitudes entre les métabolites générés chez les mammifères et chez les insectes par spectrométrie de masse et chromatographie sur couche mince.

L'objectif majeur de l'aspect métabolisme de ce projet est de déterminer si les CYP candidats mis en évidence par l'étude transcriptomique participent au métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

3.1- Approche métabolique par spectrométrie de masse

Comme décrits dans le § 2.8.2 (chapitre 8), les individus mâles adultes sont exposés à un mélange saccharose 100mM/caféine 20mM. A l'issue du test, seuls les individus ayant consommés le mélange sont sélectionnés et groupés par lots de 300 individus, ce qui constituera un réplicat biologique.

Les conditions expérimentales d'identification des métabolites de la caféine chez la drosophile ont été établies en utilisant une gamme étalon constituée des principaux métabolites standards connus chez les mammifères: la théobromine, la théophylline et la paraxanthine. Le 4^{ème} métabolite (acide 1,3,7-triméthylurique) ne sera pas présenté dans les expériences suivantes puisque ce dernier n'était pas disponible dans le commerce à cette période.

Résultats: Approche métabolique

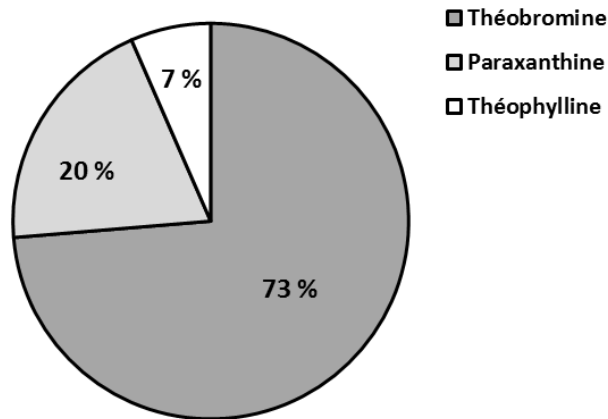


Figure 38: Proportions relatives de théobromine, paraxanthine et théophylline formés.

Quantification des différents métabolites de la caféine par spectrométrie de masse dans le corps entiers d'individus mâles adultes W_{1118} après 2 heures d'exposition à 20mM caféine. (n=4)

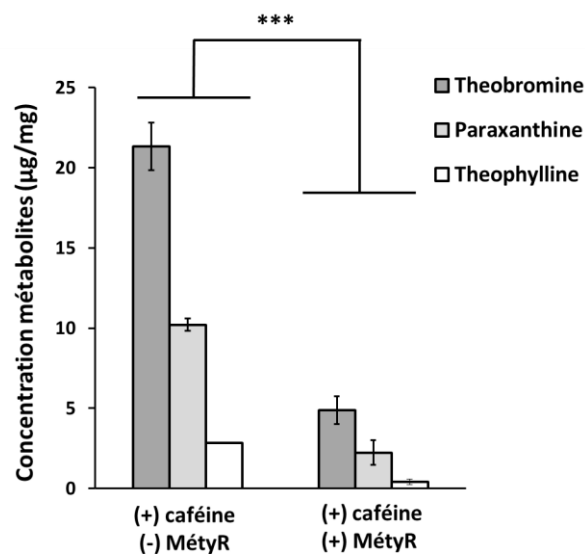


Figure 39: Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine.

Quantification de chaque métabolite de la caféine par spectrométrie de masse entre la condition contrôle (W_{1118} + caféine) et la condition traitement au métyrapone (W_{1118} + caféine + 25 mM métyrapone). Les différences statistiques entre chaque condition ont été évaluées par un test paramétrique de Student (n=4, P value: *** < 0.0001).

3.1.1- Identification de métabolites de la caféine par spectrométrie de masse

Suite à une exposition des individus sauvages W_{1118} à la caféine, nous avons déterminé les différentes proportions de métabolites formés.

La figure 38 indique que chez la drosophile, une partie de la caféine est respectivement dégradée en 73 % de théobromine (s.e.m 7 %), 20 % de paraxanthine (s.e.m 6 %) et 7 % de théophylline (s.e.m 2 %) (**Figure 38**).

3.1.2- Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine par spectrométrie de masse

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer, si comme chez les mammifères, le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP chez la drosophile. Pour cela, des individus sauvages W_{1118} ont été exposés à une solution de 20mM caféine ou un mélange caféine 20mM / métyrapone 25mM. Le métyrapone est connu pour être un inhibiteur des CYP chez les insectes.

La figure 39 indique que l'inhibition des CYP par le métyrapone entraîne une diminution significative de la quantité de chaque métabolite. En effet, la quantité de théobromine et de paraxanthine est diminuée de 80 % et celle de théophylline de 85 %. (**Figure 39**).

Ces résultats indiquent clairement que chez *Drosophila melanogaster*, le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP.

Résultats: Approche métabolique

Tableau 6: Tableau récapitulatif des CYP dont l'expression transcriptionnelle est induite par une exposition de 12 heures à 18mM de caféine dans le corps de drosophiles mâles adultes. (Données Microarray)

Gènes	Régulation	P value
<i>CYP12d1-p</i>	21.41	1.70E-03
<i>CYP12d1-d</i>	19.55	1.50E-03
<i>CYP6a8</i>	13.48	3.20E-03
<i>CYP6d5</i>	3.46	2.60E-03
<i>CYP4p1</i>	2.95	1.90E-03
<i>CYP304a1</i>	2.85	2.90E-02
<i>CYP28a5</i>	2.45	3.00E-03
<i>CYP12a5</i>	2.42	5.00E-03
<i>CYP6a9</i>	2.39	6.30E-03
<i>CYP6a20</i>	2.3	5.00E-03
<i>CYP6w1</i>	2.06	4.20E-03

Dans un 3^{ème} temps, nous nous sommes attachés à déterminer si certaines enzymes candidates identifiées *via* l'étude transcriptomique sont responsables du métabolisme de la caféine. En effet, les travaux de Kot et ses collaborateurs (2008) en particulier ont confirmé que chez les mammifères, le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP et que les EMX sont généralement inductibles par les composés qu'elles métabolisent.

Nous avons réussi à établir que le métabolisme de la caféine est également dépendant des CYP chez les insectes. Nous avons donc envisagé de tirer parti du mécanisme décrit ci-dessus et de l'étude transcriptomique menée par notre équipe pour identifier des CYP potentiellement impliqués dans le métabolisme de la caféine chez la drosophile.

3.2- Régulation transcriptionnelle des CYP par la caféine

L'étude transcriptomique décrite nous a permis d'identifier 11 CYP dont l'expression est significativement induite par une exposition à la caféine. Le tableau ci-dessus répertorie l'ensemble des CYP dont l'expression transcriptionnelle est induite par la caféine.

Nous avons donc choisi d'étudier le rôle fonctionnel des 3 candidats dont l'expression est la plus fortement induite par l'exposition à la caféine: ***CYP12d1*** (20x), ***CYP6a8*** (13x) et ***CYP6d5*** (4x) (**Tableau 7**).

Lors des premiers essais avec les lignées transgéniques, nous nous sommes heurtés à de nombreux problèmes techniques et analytiques récurrents responsables d'un retard important dans l'échéancier de mes travaux de thèse et remettant en cause la validité de ces résultats. Compte tenu, de la quantité importante de matériel biologique et du temps nécessaire à la réalisation de ces expériences, nous avons décidé de modifier notre approche expérimentale en mettant au point un protocole d'étude du métabolisme de la caféine par chromatographie sur couche mince à partir de caféine radiomarquée.

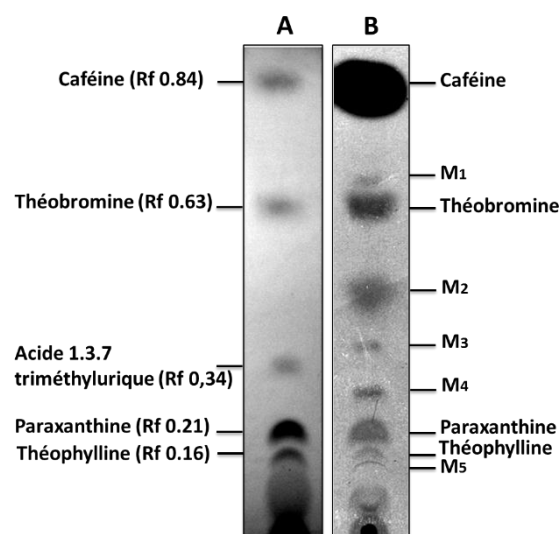


Figure 40: Métabolisme de la caféine.

A- Séparation par chromatographie sur couche mince de molécules standards: caféine, théobromine, paraxanthine, théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique révélés aux ultra-violets (UV).

B- Film autoradiographique de la séparation par chromatographie sur couche mince d'un homogénat de drosophiles W₁₁₁₈ ayant consommés de la caféine radioactive, supplémenté d'un mélange d'étalon standards no radiomarqués.

3.3- Approche métabolique par chromatographie sur couche mince

3.3.1- Caractérisation du métabolisme de la caféine chez la drosophile

L'objectif suivant était d'identifier si les principaux métabolites présents chez les mammifères, était également catabolisés chez la drosophile. Pour cela, nous avons supplémenté à l'homogénat de drosophiles, ayant consommées de la caféine radioactive, avec un mélange d'étalons standards composé de caféine, théobromine, paraxanthine, théophylline et d'acide 1,3,7-triméthylurique non radiomarqués.

La migration simultanée de métabolites froids et radiomarqués au sein d'un même mélange nous a permis d'identifier plusieurs métabolites issus de la dégradation de la caféine chez la drosophile.

La figure 40A présente le profil de séparation des métabolites non radiomarqués, révélés aux UV. La caféine et ses 4 métabolites sont distinctement séparés et migrent aux rapports frontaux suivants: la caféine (Rf_1 0,84), la théobromine (Rf_2 0,63), l'acide 1,3,7-triméthylurique (Rf_3 0,34), la paraxanthine (Rf_4 0,21) et la théophylline (Rf_5 0,16) (**Figure 40A**).

De plus, la figure 40B nous identifie qu'après 2 heures de consommation d'un mélange constitué de caféine marquée au ^{14}C et de saccharose, les individus contrôles dégradent une partie de la caféine. Plusieurs molécules radiomarquées issues de la dégradation de la caféine sont visibles et distinctement séparées. On dénombre 9 bandes dont 8 métabolites distincts (**Figure 40B**).

Ces résultats montrent que chez la drosophile, une partie de la caféine est métabolisée en théobromine, en paraxanthine et en théophylline (**Figure 40**).

En revanche, nous n'avons pas clairement identifié la présence de l'acide 1,3,7-triméthylurique dans l'homogénat de drosophiles avec cette méthode. En effet, aucune bande dans l'homogénat contenant les métabolites radiomarqués ne migre à la Rf de l'acide 1,3,7-triméthylurique (**Figure 40B**).

Résultats: Approche métabolique

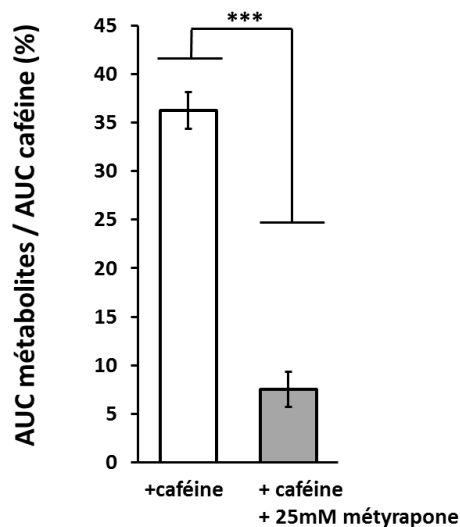


Figure 41: Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine.

Quantification globale des métabolites de la caféine par densitomètre entre la condition contrôle (W_{1118} + caféine) et la condition traitement au métyrapone (W_{1118} + caféine + 25mM métyrapone). Les différences statistiques entre chaque condition ont été évaluées par un test paramétrique de Student ($n=3$, *** P value < 0.0001).

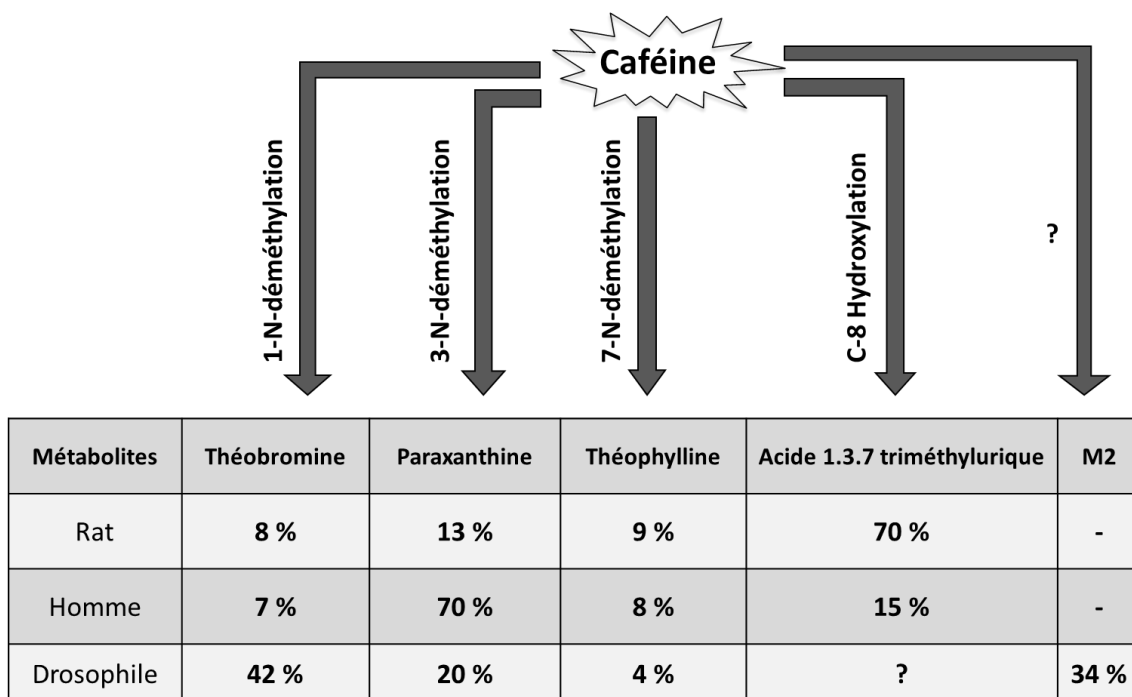


Figure 42: Comparaison des proportions relatives des 4 métabolites majoritaires entre la drosophile (*Drosophila melanogaster*), l'Homme (*Homo sapiens*) et le rat (*Rattus norvegicus*).

Analyse densitométrique des proportions des différents métabolites de la caféine chez des individus W_{1118} après 2 heures d'exposition à la caféine ($n=3$).

3.3.2- Implication des CYP dans le métabolisme de la caféine

Pour confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse, nous avons voulu vérifier si le métabolisme de la caféine chez la drosophile est dépendant des CYP. Pour cela, nous avons exposé des drosophiles à de la caféine combinée au métyrapone.

La figure 41 indique que l'inhibition des CYP par le métyrapone entraîne une diminution significative de la quantité globale de l'ensemble des métabolites. En effet, la quantité globale des métabolites de la caféine est approximativement diminuée de 80 % (**Figure 41**).

En parallèle, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de différence de consommation entre les individus testés pour chaque condition. Ces résultats confirment que le métabolisme de la caféine est dépendant des CYP chez cet insecte.

3.3.3- Quantification des métabolites de la caféine

La caractérisation du métabolisme de la caféine nous a permis de calculer la proportion des métabolites de la caféine formés chez la drosophile.

La figure 42 indique que chez la drosophile, une partie de la caféine est dégradée en 42 % (s.e.m +/- 1,70) de théobromine, 34 % (s.e.m +/- 0,70) d'un métabolite inconnu nommé M₂, 20 % (s.e.m +/- 0,46) de paraxanthine et 4 % (s.e.m +/- 0,71) de théophylline (**Figure 42**). Ces résultats indiquent que la théobromine est le métabolite majoritaire issu de la dégradation de la caféine et confirment les résultats obtenus en spectrométrie de masse.

Les proportions de métabolites de la caféine diffèrent entre les espèces. En effet, au sein des mammifères, le métabolite majoritaire chez l'homme est la paraxanthine (70 %) alors que chez le rat, le métabolite majoritaire est l'acide 1,3,7-triméthylurique (70 %) (**Figure 42**).

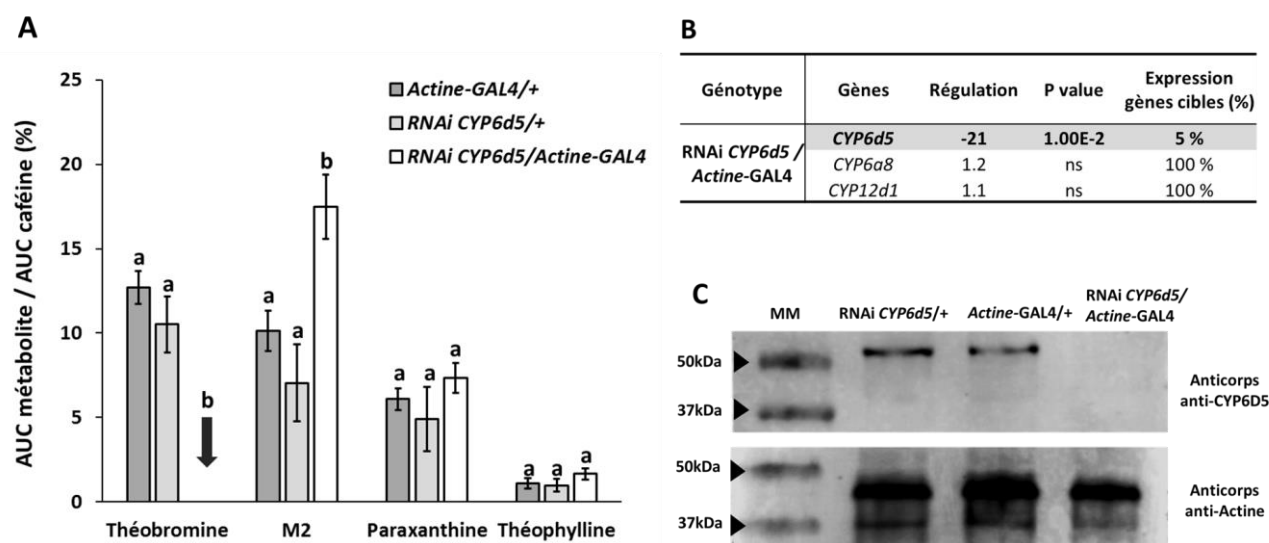


Figure 43: Rôle de *CYP6d5* dans la dégradation de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

A- Quantification des métabolites de la caféine par densitométrie chez les individus transgéniques RNAi*CYP6d5*/ *Actine-GAL4* et contrôles RNAi*CYP6d5*/+ et *Actine-GAL4*/+. Les différences statistiques pour chaque métabolite ont été évaluées par une ANOVA à un facteur (n=3).

B- Quantification du niveau d'expression transcriptionnel des gènes *CYP6d5*, *CYP12d1* et *CYP6a8* dans le corps entiers des individus transgéniques RNAi*CYP6d5*/*Actine-GAL4* par RT-q-PCR. Les différences statistiques ont été évaluées avec la macro d'analyse REST (n>3, * P value < 0.05).

C- Quantification de l'expression de la protéine CYP6D5 par Western blot dans le corps entier d'individus transgéniques RNAi*CYP6d5*/*Actine-GAL4* et les lignées contrôles RNAi*CYP6d5*/+ et *Actine-GAL4*/+.

3.4- Rôle fonctionnel des CYP dans le métabolisme de la caféine

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de chaque candidat dans la dégradation de la caféine, nous avons par la suite utilisé les individus transgéniques exprimant les ARN interférents spécifiques de chaque CYP étudié sous contrôle du driver ubiquiste *Actine-GAL4*.

3.4.1- Rôle de *CYP6d5* dans le métabolisme de la caféine

La figure 43A montre une disparition de la théobromine et une augmentation significative de la quantité du métabolite M₂ chez les individus transgéniques RNAi *CYP6d5/Actine-GAL4*. En revanche, la modulation de l'expression de *CYP6d5* n'entraîne pas de modification de la quantité de paraxanthine et de théophylline formée (**Figure 43A**).

En parallèle, nous avons vérifié par PCR quantitative et Western blot, l'efficacité de l'ARN interférent spécifique de *CYP6d5* dans le corps entier des individus transgéniques en comparaison avec les lignées contrôles. Les figures 43 B & C indiquent clairement que le niveau d'expression transcriptionnel et traductionnel de *CYP6d5* est très fortement diminué. En revanche, on remarque que le niveau d'expression de *CYP12d1* et *CYP6a8* n'est pas affecté (**Figure 43B**).

Ces résultats montrent que le gène *CYP6d5* intervient dans la transformation de la caféine en théobromine et suggèrent que cette enzyme intervient dans la dégradation du métabolite M₂ en un métabolite secondaire inconnu.

3.4.2- Rôle de *CYP6a8* dans le métabolisme de la caféine

La figure 44A indique qu'une diminution de l'expression de *CYP6a8* dans l'ensemble de cellules du corps chez les individus transgéniques RNAi *CYP6a8/Actine-GAL4* entraîne une augmentation significative de la quantité de théobromine, du métabolite M₂ et de la théophylline en comparaison avec les lignées contrôles. En revanche, la modulation du niveau d'expression de *CYP6a8* n'affecte pas la quantité de paraxanthine formée.

Résultats: Approche métabolique

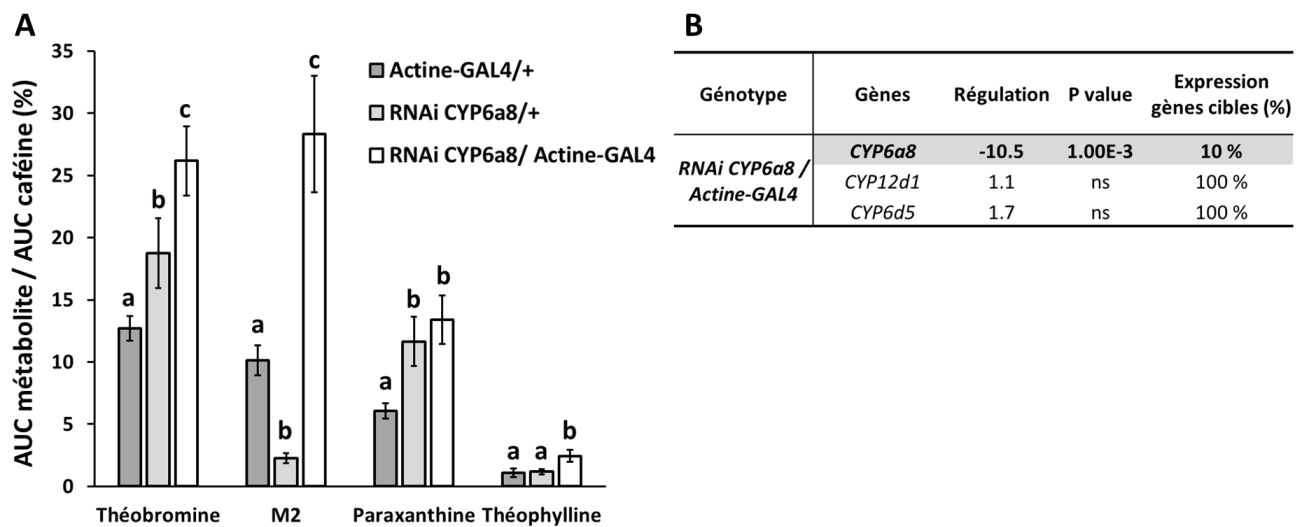


Figure 44: Rôle de *CYP6a8* dans la dégradation de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

A- Quantification des métabolites de la caféine par densitométrie chez les individus transgéniques RNAi*CYP6a8*/Actine-GAL4 et contrôles RNAi*CYP6a8*/+ et Actine-GAL4/+. Les différences statistiques pour chaque métabolite ont été évaluées par une ANOVA à un facteur (n=3).

B- Quantification du niveau d'expression transcriptionnel des gènes *CYP6a8*, *CYP12d1* et *CYP6d5* dans le corps entiers des individus transgéniques RNAi*CYP6a8*/Actine-GAL4 par RT-q-PCR. Les différences statistiques ont été évaluées avec la macro d'analyse REST (n>3, * P value < 0.05).

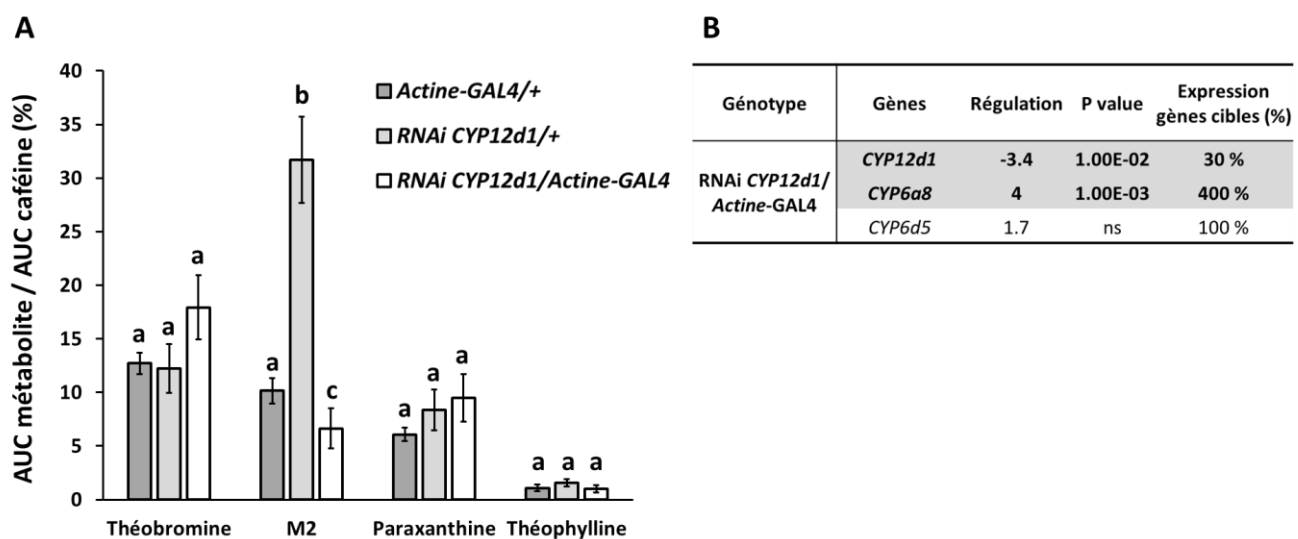


Figure 45: Rôle de *CYP12d1* dans la dégradation de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

A- Quantification des métabolites de la caféine par densitométrie chez les individus transgéniques RNAi*CYP12d1*/ Actine-GAL4 et contrôles RNAi*CYP12d1*/+ et Actine-GAL4/+. Les différences statistiques pour chaque métabolite ont été évaluées par une ANOVA à un facteur (n=3).

B- Quantification du niveau d'expression transcriptionnel des gènes *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5* dans le corps entiers des individus transgéniques RNAi*CYP12d1*/Actine-GAL4 par RT-q-PCR. Les différences statistiques ont été évaluées avec REST (n>3, * P value < 0.05).

La figure 44B montre que les individus RNAi*CYP6a8/Actine-GAL4* présentent une diminution de l'expression de *CYP6a8* de 90 % alors que le niveau d'expression de *CYP12d1* et *CYP6d5* n'est pas modulé (**Figure 44**). Cette expérience suggère une implication de *CYP6a8* dans la biotransformation de la théobromine, du métabolite M₂ et de la théophylline en métabolites secondaires inconnus.

3.4.3- Rôle de *CYP12d1* dans le métabolisme de la caféine

Chez les individus transgéniques RNAi *CYP12d1/Actine-GAL4*, la quantité du métabolite M₂ est significativement diminuée alors que les quantités de théobromine, paraxanthine et de théophylline ne sont pas modifiées (**Figure 45A**). Le niveau d'expression de *CYP12d1* est diminué de 70 % alors que celui de *CYP6a8* est fortement augmenté (400 %) et celui de *CYP6d5* n'est pas modifié dans le corps entier des individus RNAi*CYP12d1/Actine-GAL4* (**Figure 45B**). Ces résultats suggèrent un éventuel rôle de *CYP12d1* dans la dégradation de la caféine en métabolite M₂.

Conclusion

Nous avons mis en évidence que chez *Drosophila melanogaster*, la caféine est dégradée en plusieurs métabolites. A l'instar des mammifères, nous avons identifié plusieurs métabolites tels que la théobromine, la paraxanthine et la théophylline. La théobromine est majoritaire parmi les métabolites identifiés ce qui est original par rapport aux mammifères. En revanche, notre protocole ne nous a pas permis d'identifier l'acide 1,3,7-triméthylurique. Nous avons également mis en évidence, en utilisant deux techniques différentes, que le métabolisme de la caféine chez l'insecte est également dépendant des CYP. L'étude transcriptomique menée par notre équipe nous a permis d'identifier de nombreux CYP dont l'expression est fortement induite par la caféine tels que *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5*. Nos expériences suivantes nous ont permis d'établir clairement que ***CYP6d5*** est impliqué à la fois dans la transformation de la caféine en théobromine et dans la transformation du métabolite M₂ en un métabolite inconnu. De plus, nous avons montré que ***CYP6a8*** serait impliqué dans la dégradation de plusieurs métabolites: la théobromine, la théophylline et le métabolite M₂. Enfin ***CYP12d1*** pourrait biotransformer la caféine en métabolite M₂. Nous avons également mis en évidence une régulation compensative de l'expression transcriptionnelle entre les gènes *CYP12d1* et *CYP6a8*.

Discussion et Perspectives

Chapitre 7: Discussion / Perspectives

L'objectif de ce travail était d'identifier et d'étudier le rôle fonctionnel des EMX et plus particulièrement celui des Cytochromes P450 (CYP) dans la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

Partie 1: Intérêt de l'étude transcriptomique

Plusieurs études antérieures ont montré qu'une exposition à de nombreuses molécules aversives telles que le phénobarbital, le DTT et la caféine entraînait une régulation transcriptionnelle de certaines EMX, chez la larve et l'adulte des insectes (Bhaskara *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006). Généralement, ces approches transcriptionnelles visent essentiellement à mettre évidence le développement d'une résistance vis-à-vis de molécules potentiellement toxiques comme les insecticides. (Daborn *et al.*, 2001, Daborn *et al.*, 2002, Giraudo *et al.*, 2010, Le Goff *et al.*, 2006, Misra *et al.*, 2011, Morra *et al.*, 2010). Bien que l'étude des interactions EMX / caféine soit prédominante dans les thématiques écologiques et représente un intérêt scientifique en soi, l'objectif de notre étude transcriptomique était de mettre en évidence une interaction EMX / caféine dans les composantes gustatives d'une part et métaboliques d'autre part, jusque-là encore très peu étudiée. La caféine est une molécule sensorielle qui va être détectée et perçue au niveau du système nerveux périphérique puis du système nerveux central et entraîner une réponse comportementale d'évitement adaptée à la survie de l'animal. La caféine, qui est potentiellement toxique, va être biotransformée dans les tissus gustatifs puis dans le tractus digestif, afin d'être éliminée hors de l'organisme.

Pour la première fois, l'étude transcriptomique menée au sein de notre laboratoire a permis de caractériser l'ensemble des gènes dont l'expression est modulée dans les organes sensoriels et dans l'ensemble du corps après une ingestion de caféine (12 heures d'exposition) chez la drosophile mâle adulte.

Nous avons répertorié de nombreux gènes appartenant aux différentes phases des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (CYP, UGT/GST, Transporteurs) dont l'expression est modulée par la caféine.

Nous avons également répertorié des familles de protéines appartenant aux événements péri-récepteurs tels que les protéines de transport (OBP) mais également des récepteurs sensoriels dont l'expression paraît être modulée par la perception et l'ingestion de caféine.

Nous avons ainsi mis en évidence l'ensemble des acteurs participant potentiellement à la prise en charge, la dégradation, la signalisation et à l'élimination de la caféine dans les appendices sensoriels et dans le corps de la drosophile.

Cela correspond à ce que l'on pourrait appeler le « péri-réceptome » de la caféine, c'est-à-dire le réseau de protéines impliquées dans les événements péri-récepteurs liés à une perception gustative dans les appendices sensoriels et à l'ingestion/détoxication de la caféine dans le corps de la drosophile. Cependant les interactions des différentes protéines de ce réseau restent à déterminer. En effet, si on prend uniquement le cas des EMX, des interactions coopératives et fonctionnelles entre ces protéines (phase I-phase I, phase II-phase II, phase I-phase II) ont été démontrées (Ishii *et al.*, 2007) ce qui étend la complexité du péri-réceptome. Ces protéines pourraient également interagir avec les récepteurs comme cela a été proposé entre les OBP et les récepteurs olfactifs.

Partie 2: Perception sensorielle de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

2.1- La caféine induit l'expression d'EMX dans les organes sensoriels (antennes / pattes/ ailes/ proboscis) chez *Drosophila melanogaster*

Parmi les gènes du péri-réceptome de la caféine les plus fortement induits dans les appendices sensoriels, nous avons répertorié plusieurs candidats tels que les enzymes dites de Phase I (*CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6d5*, *CYP4d14* et *CYP4d1*), des enzymes de phase II (*GSTD2*, *GSTD7*, *GSTD5*, *UGT86Dd*, *UGT36Bb*) et des transporteurs dits de phase III (*MDR50c*, *MRP1*).

Parmi ces candidats, certains ont déjà été identifiés comme étant induits par d'autres molécules aversives telles que le phénobarbital et l'éthanol, attestant ainsi leur rôle majeur dans la détoxication d'un large éventail de xénobiotiques (Bhaskara *et al.*, 2006, Daborn *et al.*, 2001, Le Goff *et al.*, 2006, Misra *et al.*, 2011, Morra *et al.*, 2010, Willoughby *et al.*, 2006). Des protéines de transport, *OBP50c* et *OBP56f*, fortement induites dans les appendices sensoriels ont également été identifiées et pourraient jouer un rôle dans le transport de la caféine.

Le niveau d'induction des gènes candidats a été vérifié par RT-q-PCR. On remarque que les gènes annotés comme étant sur-exprimés par l'étude transcriptomique sont également sur-exprimés par PCR quantitative. Toutefois, pour certains candidats (*CYP6a8*, *CYP6d5*) l'écart entre les niveaux d'expression peut se montrer important. Cela peut peut-être s'expliquer par les différentes techniques et les outils d'analyses utilisés.

Chez les mammifères, il est connu qu'un ligand peut également induire la transcription de son récepteur, nous nous attendions donc à observer une modulation de l'expression des récepteurs gustatifs sensibles à la caféine tels que *Gr66a*, *Gr33a* et *Gr93a*.

Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'expression d'aucun récepteur sensoriel n'est modulée par la caféine dans les organes sensoriels. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les récepteurs exprimés au niveau des neurones dans les appendices sensoriels ne seraient peut-être pas soumis à la régulation génique mais pourrait être déjà synthétisés et recrutés en présence d'une concentration élevée de xénobiotiques et ainsi assurer une dynamique de transduction du signal rapide et efficace.

Il est aussi envisageable que 12 heures d'exposition à la caféine soit un temps trop long pour observer une régulation génique des récepteurs sensoriels au niveau des appendices sensoriels. En effet, les organes sensoriels constituent la première barrière entre le système chimiosensoriel de l'animal et son environnement et ils doivent être sensibles et rapides dans le traitement des informations sensorielles. Après 12 heures d'exposition, la détection de la caféine constituerait moins une modalité sensorielle qu'une modalité post-ingestive de la caféine. En revanche, d'après notre mise au point, cette durée d'exposition est adaptée à la régulation des EMX.

Afin d'éclaircir ce point, il serait intéressant de réaliser une étude transcriptomique afin d'étudier plus précisément la cinétique d'expression des récepteurs sensibles à la caféine dans les appendices sensoriels suite à une exposition de 1 heure et de 6 heures.

2.2- La perception de la caféine peut être perturbée par une diminution de l'expression des CYP dans les organes sensoriels

Afin d'identifier un éventuel rôle des CYP dans la perception sensorielle de la caféine, nous nous sommes intéressés à l'organisation de la sensille gustative au niveau du probosci

ainsi qu'aux différentes populations de cellules participant à la réception et au traitement du signal sensoriel par le SNC.

Compte tenu du rôle fondamental des neurones sensoriels dans la transduction du signal sensoriel, nous avons décidé tout d'abord, d'étudier l'impact de l'inhibition de nos CYP candidats dans les neurones sensoriels. De plus, au sein de la sensille, les neurones cohabitent avec 3 types de cellules nourricières dites « accessoires »: thormogènes, tricogènes et techogènes. La proximité entre les neurones sensoriels et les cellules accessoires font de ces dernières une cible intéressante dans l'étude de l'implication des CYP dans la modulation de la perception sensorielle.

Lorsque les tests de comportement ont été réalisés, nous ne disposions pas encore d'anticorps anti-CYP afin de valider la pertinence des lignées GAL4 utilisées. Cependant compte tenu de l'organisation des sensilles sensorielles, notre choix s'est porté sur trois lignées GAL4 distinctes: deux lignées neuronales *neuralized*-GAL4 et *Gr66a*-GAL4 qui permettent respectivement de cibler l'ensemble des neurones du système chimiosensoriel et les neurones portant les récepteurs sensibles à la caféine et la lignée *Cut*-GAL4 spécifique des cellules accessoires.

2.2.1- Ciblage des neurones sensoriels (*neuralized*-GAL4 ; *MB247*-GAL4 et *Gr66a*-GAL4)

Nous avons étudié les conséquences d'une diminution (RNAi) de l'expression des CYP les plus induits par la caféine, dans les neurones des organes sensoriels (*via neuralized*-GAL4 et *Gr66a*-GAL4) sur la perception de la caféine à l'aide du test gustatif à double choix (MultiCAFE). Nous avons vérifié en parallèle par RT-q-PCR que le niveau d'expression des candidats dans les lignées transgéniques correspondantes était diminué dans les organes sensoriels. A l'issue des tests de perception, les individus transgéniques *RNAiCYP/neur-GAL4* et *RNAiCYP/Gr66a-GAL4* pour *CYP6a8*, *CYP6d5* et *CYP4d14* présentent une perception de la caféine altérée. L'activité neuronale de *CYP6a8*, *CYP6d5* et *CYP4d14* semble intervenir dans la perception de la caféine.

La protéine Neuralized s'exprime dans les organes sensoriels mais également dans les corps pédonculés (*MB247*-GAL4) qui font partie du système nerveux central. Nous avons donc vérifié qu'une diminution de l'expression de ces CYP dans le SNC n'affectait pas la perception de la caféine. C'est effectivement le cas, en revanche nous avons constaté qu'une diminution de l'expression de *CYP6a8* dans les corps pédonculés (*MB247*-GAL4) semble modifier le profil de

consommation des individus *CYP6a8* transgéniques suggérant un rôle de *CYP6a8* dans le système nerveux central.

Il faut noter que les tests gustatifs réalisés avec les individus issus des deux lignées pilotes GAL4 (*neuralized* et *Gr66a*) ont indiqué des résultats similaires sur la perception de la caféine. Ces résultats suggèrent un chevauchement des patrons d'expression de ces deux lignées pilotes. Il serait intéressant de confirmer une éventuelle co-expression entre ces deux sous-populations de neurones par immunohistochimie.

A l'issu des résultats comportementaux avec les candidats *CYP6d5* et *CYP4d14*, nous avons décidé d'axer notre étude sur *CYP6d5* car la diminution ciblée de ce candidat dans les neurones sensoriels entraîne une perturbation de la perception de la caféine la plus significative.

Les processus péri-récepteurs impliquant les EMX sont des processus périphériques dans la physiologie globale de la gustation. Une perspective importante de nos résultats comportementaux serait de mesurer l'activité neuronale périphérique des différentes lignées transgéniques *CYP6d5* après une stimulation à la caféine. Ceci peut être réalisé par électrophysiologie monosensillaire en particulier sur la sensille S5 du proboscis qui semble être la sensille la plus sensible pour enregistrer l'activité des neurones L2 après une stimulation à la caféine (Ling *et al.*, 2014, Weiss *et al.*, 2011).

2.2.2- Etude de la dérégulation de *CYP6d5* via la lignée élément P (26475)

Afin de mettre en évidence un rôle de *CYP6d5* dans la perception de la caféine. Nous avons utilisé une lignée d'insertion qui présente un transposon au niveau de l'exon 2 pouvant potentiellement perturber l'expression de *CYP6d5*. Les tests comportementaux avec cette lignée montrent une perturbation importante de la perception de la caféine confirmant le rôle de *CYP6d5* dans cette détection. Bien que cette lignée P n'ait pas été caractérisée par PCR inverse, nous avons plusieurs arguments montrant que l'insertion de l'élément P au niveau de l'exon 2 de *CYP6d5* entraîne une dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle de *CYP6d5*.

La caractérisation de l'élément P pourra être complétée en analysant les séquences adjacentes du lieu d'insertion par PCR- inverse et séquençage et en générant des lignées d'excision propre de l'élément P (rescue).

2.2.3 Ciblage dans les cellules accessoires (*Cut*-GAL4)

L'une des étapes délicate de ce projet a été d'identifier et de sélectionner un marqueur des cellules accessoires exprimé dans le proboscis. A ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur les marqueurs des cellules accessoires dans le proboscis.

Nous avons arrêté notre choix sur le marqueur *Cut* qui est un marqueur de toutes les cellules accessoires (thormogènes, tricogènes et techogènes) dans le système mécano-sensoriel de l'aile (Van De Bor & Giangrande 2001).

Tout d'abord, nous avons vérifié si nous pouvions extrapoler son expression dans le proboscis. Nous avons mis en évidence que *Cut* s'exprime au sein du proboscis dans des cellules non neuronales, cependant nous n'avons aucune information sur le type de cellules accessoires marquées dans le proboscis.

A l'issu des tests comportementaux, nous n'avons pas observé d'effet de la diminution de l'expression de *CYP6d5* spécifiquement dirigée dans les cellules exprimant *Cut* dans la détection de la caféine.

Afin de compléter cette étude comportementale, plusieurs perspectives intéressantes pourront être envisagées. Tout d'abord, nous pourrions tester 2 autres lignées GAL4 décrites comme étant spécifiques des cellules accessoires: *nompA* et *ASE5* qui s'expriment respectivement dans les cellules techogènes et thormogènes. Ensuite, il serait également intéressant de déterminer si *CYP6d5* présente un rôle dans la détection de la caféine *via* les cellules gliales en utilisant la lignée driver *Repo*-GAL4, après avoir au préalable déterminé une éventuelle co-expression entre les cellules exprimant *Repo* et *CYP6D5* par immunohistochimie.

Les EMX sont organisées en un réseau complexe d'enzymes chevauchantes. Plusieurs enzymes de la même famille ou de phases différentes peuvent intervenir dans la dégradation d'une même molécule. Qu'en est-il de l'organisation des EMX dans la perception sensorielle de la caféine ? Il serait très intéressant de générer des lignées doubles RNAiCYP pour *CYP6d5* et *CYP4d14* par exemple et ainsi nous pourrions peut-être observer cet « effet cumulatif » dans l'altération de la perception de la caféine. Par ailleurs, il serait intéressant de générer des lignées

doubles RNAi en combinant des enzymes de différentes phases (CYP et UGT par exemple) parmi le péri-réceptome de la caféine, afin de mettre en évidence si des EMX d'autres classes participent à la perception sensorielle de la caféine.

2.3- Localisation de *CYP6d5* par hybridation *in situ* et immunohistochimie

Nous avons basé notre projet sur l'identification par analyse transcriptomique d'EMX candidates potentiellement impliquées dans la perception de la caféine. Les tests gustatifs sur les lignées RNAi impliquent effectivement *CYP6d5* dans la perception de la caféine. Nous avons donc souhaité mettre en corrélation ces résultats avec la localisation de *CYP6d5*.

Compte tenu de la proximité entre les molécules sensorielles et les neurones sensoriels et du rôle de détoxification des CYP, il semblait judicieux de s'intéresser à une éventuelle co-localisation de *CYP6d5* avec un ou plusieurs type cellulaire abrités par la sensille telles que les neurones et les cellules accessoires afin d'asseoir l'hypothèse d'une implication des CYP dans la dynamique rapide et efficace des récepteurs.

A l'issue de l'étude du patron d'expression de *CYP6d5* par hybridation *in situ* et immunohistochimie, nous avons mis en évidence 3 zones d'expression de *CYP6d5*.

Tout d'abord, nous avons observé que *CYP6d5* s'exprime au niveau des cellules de l'épiderme du proboscis. Celles-ci constituent une première barrière de protection du proboscis à l'instar de la peau chez l'homme. Compte tenu du rôle de détoxification premier des CYP, nous pouvons conclure que *CYP6d5* y joue un rôle de protection.

De la même manière, nous avons constaté que *CYP6d5* s'exprime également au niveau des cellules bordant les trachées. Les trachées sont un lieu d'échange de gaz entre l'environnement et l'animal, la présence d'enzyme de détoxification en bordure des trachées renforce leur rôle dans la détoxification de l'organisme.

Par ailleurs, nous avons également remarqué que *CYP6d5* s'exprime dans une structure située à la base des sensilles sensorielles, au niveau des poches sensillaires. Bien que le marquage se révèle très diffus et granuleux, nous avons établi une co-expression de *CYP6d5* avec la membrane plasmique des neurones sensoriels et des cellules accessoires.

Discussion / Perspectives: Approche chimiosensorielle

En effet, dans la littérature, les cellules accessoires sont décrites comme entourant les neurones et formant une sorte de gaine de protection pluristratifiée. Lorsque l'expression de *Cut* est adressée à la membrane plasmique dans la lignée transgénique *Cut-GAL4 / UAS-mCD8-GFP*, l'ensemble des cellules accessoires de la poche sensillaire exprimant *Cut* sont mises en évidence par un marquage très diffus et granuleux. Nous avons remarqué que le profil d'expression de *CYP6d5* est similaire à celui de *Cut-GAL4 / UAS-mCD8-GFP* suggérant que *CYP6d5* s'exprime au niveau de la membrane plasmique des cellules accessoires.

Le schéma ci-dessous propose le mécanisme d'action soulevé pour notre étude:

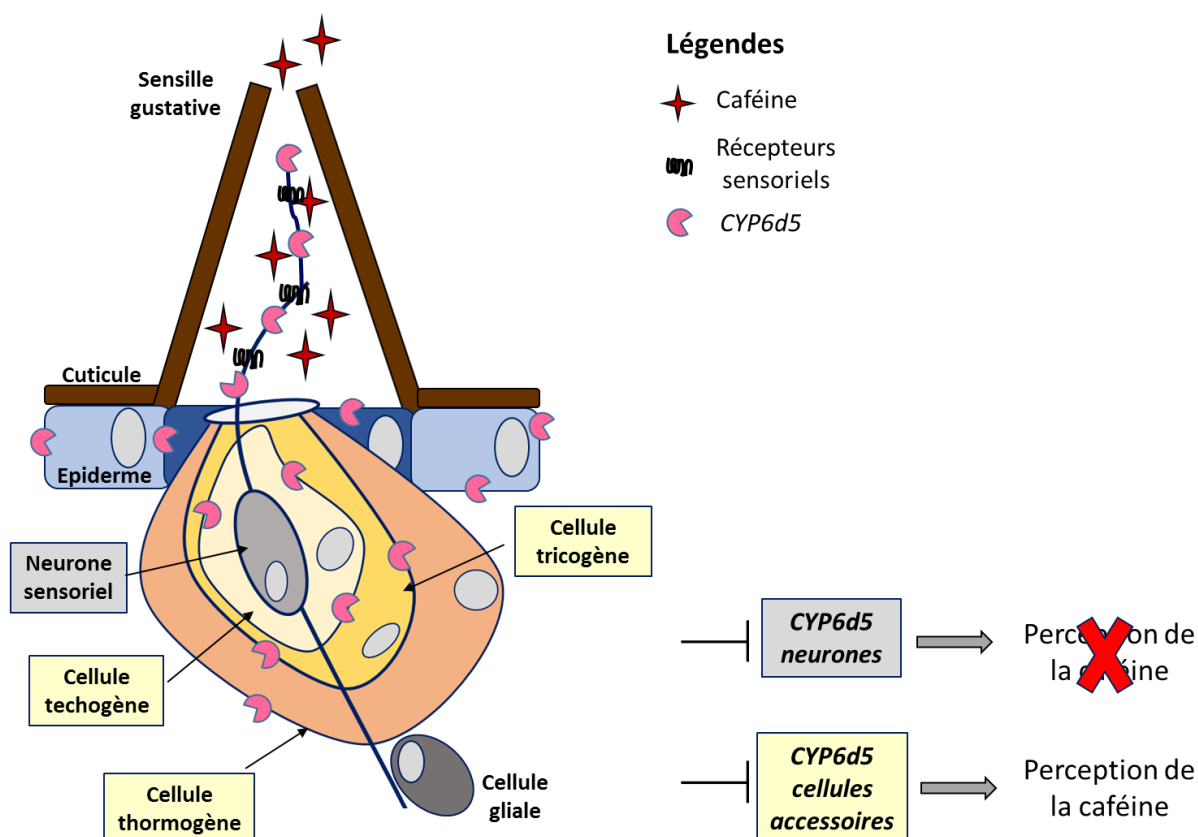


Figure 46: Schéma hypothétique du mécanisme d'action de *CYP6d5* membranaire dans la perception sensorielle de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

CYP6d5 est exprimé à la membrane des neurones et des cellules accessoires dans les sensilles gustatives ainsi que dans les cellules épidermiques du proboscis. L'inhibition ciblée de *CYP6d5* dans les neurones entraîne une perturbation de la perception de la caféine. Ceci s'expliquerait par une implication de *CYP6d5* dans la dynamique de clairance du récepteur sensoriel, permettant à ce dernier de conserver sa sensibilité.

En effet, une étude récente a montré que chez les mammifères, plusieurs CYP étaient adressés à la membrane plasmique (Neve & Ingelman-Sundberg 2008) et chez l'insecte, cette hypothèse a également été formulée en proposant que les CYP soient ancrés dans la membrane plasmique avec leurs sites actifs dirigés vers l'espace extracellulaire afin d'expliquer l'aspect dynamique et réactif des phénomènes se produisant dans l'espace péri-récepteur (Maibeche-Coisne *et al.*, 2004b). En perspective, une étude par microscopie électronique permettrait de conclure sur cette localisation.

2.4- Rôle de *CYP6d5* dans la perception sensorielle de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

De manière originale, nos résultats suggèrent que *CYP6d5* s'exprime au niveau de la membrane plasmique des neurones sensoriels et qu'une diminution de l'expression ciblée dans les neurones sensoriels provoque une perturbation de la perception à la caféine. Ainsi une exposition à la caféine, en l'absence ou en présence de faible quantité de *CYP6d5* entraînerait une saturation du récepteur sensible à la caféine provoquant une altération de la perception de la caféine.

En revanche, bien que *CYP6d5* semble également être adressée à la membrane des cellules accessoires, une inhibition ciblée de *CYP6d5* ne semble pas altérer la perception de la caféine. Ce phénotype comportemental peut s'expliquer par le fait que les cellules accessoires n'expriment pas les récepteurs sensoriels sensibles à la caféine et ne participent pas la transduction du signal sensoriel. Ainsi une inhibition de l'expression *CYP6d5* au niveau de la membrane des cellules accessoires n'aurait pas d'impact sur la perception de la caféine.

Notre étude conforterait l'hypothèse émise dans l'étude de (Maibeche-Coisne *et al.*, 2004b), suggérant une localisation d'un CYP au niveau de la membrane cytoplasmique avec un site actif dirigé vers l'espace extracellulaire (**Figure 46**).

L'hypothèse de la sécrétion de *CYP6d5* dans la lymphe sensillaire laisse penser qu'un effet comportemental aurait dû être observé lorsque l'expression de *CYP6d5* est inhibée dans les neurones sensoriels et dans les cellules accessoires. Or, seule une inhibition dans les neurones provoque une altération de la perception de la caféine. Ces résultats pourraient s'expliquer par une sécrétion basale de *CYP6d5* différentielle entre les neurones et les cellules accessoires correspondant à une sécrétion plus importante de *CYP6d5* dans les neurones.

Partie 3: Métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

3.1- La caféine induit une régulation de l'expression d'EMX dans le corps (abdomen /thorax)

Plusieurs gènes induits dans les appendices sensoriels et dans le corps (*CYP12d1*, *CYP6a8*, *CYP6d5*, *CYP4p1*, *CYP304a1*, *CYP6a9*, *CYP6a20* et *GSTD5*) ont déjà été répertoriés dans des travaux antérieurs sur la régulation des EMX dans la résistance aux insecticides (Daborn *et al.*, 2012, Le Goff *et al.*, 2006, Willoughby *et al.*, 2006). Nous avons également remarqué que les 3 CYP les plus fortement induits dans les appendices sensoriels sont également ceux les plus fortement exprimés dans les corps. Cette observation renforce l'idée d'un rôle de ces CYP dans la prise en charge et la dégradation de la caféine.

Parmi, les gènes dont l'expression est modulée par la caféine, nous avons également observé plusieurs enzymes du péri-réceptome de la caféine (OBP, CYP, GST, UGT, transporteurs) dont l'expression est fortement diminuée par l'exposition à la caféine. Cette constatation est surprenante car la logique voudrait qu'un organisme mobilise l'ensemble de son système de détoxification pour éliminer une molécule potentiellement toxique. La sous-expression d'EMX suite à une exposition à un xénobiotique est très peu documentée dans la littérature. On peut supposer que dans certains cas particuliers, l'organisme programme certains gènes d'EMX afin que leur expression ne soit pas induite par leur ligand, mais au contraire réprimée afin de conserver la biodisponibilité du ligand. Par exemple, l'acide lithocholique (un acide biliaire synthétisé par la flore intestinale chez l'homme), dont les propriétés anticancéreuses ont été démontrées, inhibe UGT2B7, l'enzyme chargée de son catabolisme (Lu *et al.*, 2005).

Cette inhibition concernerait des enzymes dont l'activité parasiterait celle des enzymes impliquées dans le métabolisme de la caféine, peut être en perturbant les interactions coopératives des EMX (phase I-phase I, phase II-phase II, phase I-phase II) qui ont été démontrées (Ishii *et al.*, 2007).

L'analyse des données transcriptomiques est un exercice très délicat à effectuer, d'autant plus que les EMX sont organisées en réseau d'enzymes aux activités chevauchantes et aux interactions fonctionnelles. Mais, elle nous a cependant permis de suggérer l'existence d'un réseau de protéines potentiellement impliquées dans la prise en charge, la dégradation, l'interaction ligand / récepteur et l'élimination de la caféine dans le corps de la drosophile.

Afin d'impliquer fonctionnellement les CYP dans le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*, nous avons sélectionné les 3 CYP les plus fortement induits par la caféine dans le corps: ***CYP12d1***, ***CYP6a8*** et ***CYP6d5***.

3.2-Caractérisation du métabolisme de la caféine

Chez les mammifères, la caféine est principalement métabolisée par CYP1A2 en 4 métabolites: paraxanthine, théobromine, théophylline et l'acide 1,3,7-triméthylurique (Kot & Daniel 2008b).

Pour la première fois chez les insectes, nous avons montré que la caféine ingérée est dégradée en 8 métabolites distincts. Parmi ces métabolites, nous en avons répertorié 4 qui sont majoritaires dont 3 qui sont communs avec les vertébrés, à savoir la théobromine, la paraxanthine et la théophylline et un métabolite nommé M₂ que nous n'avons pas encore identifié mais qui devra être caractérisé ultérieurement par HPLC préparative et RMN.

La dégradation de la caféine en théobromine, en paraxanthine et en théophylline implique une conservation entre vertébrés et invertébrés de la voie de dégradation par N-déméthylation.

Chez les mammifères, le métabolite majoritairement synthétisé à partir de la caféine varie entre les espèces. Par exemple chez l'homme, la paraxanthine est la forme la plus métabolisée alors que chez le rat et le singe, c'est respectivement l'acide 1,3,7-triméthylurique et la théophylline qui sont les métabolites majoritaires (Berthou *et al.*, 1992, Bonati *et al.*, 1984).

Chez la drosophile, notre étude a révélé que la caféine est majoritairement métabolisée en théobromine, cela suggère l'existence de mécanisme enzymatique propre à la drosophile vis-à-vis de la caféine.

Dans l'étude du métabolisme de la caféine chez la drosophile, nous n'avons pas pu identifier l'acide 1,3,7-triméthylurique. Plusieurs hypothèses se posent :

- l'acide 1,3,7-triméthylurique est issu d'une hydroxylation en C-8 de la caféine chez les mammifères et il se pourrait que cette voie métabolique n'existe pas chez la drosophile.

- Le profil de migration des métabolites radiomarqués dérivant de la caféine chez la drosophile montre deux métabolites avec un temps de rétention très proche de celui de l'acide triméthylurique. Selon l'étude de (Benckroun *et al.*, 1997), le marquage radioactif peut modifier légèrement le profil de migration de certaines molécules. S'il s'avère que le marquage radioactif de cette molécule peut modifier son temps de rétention, il se pourrait que l'acide 1,3,7-triméthylurique soit l'un de ces métabolites mais l'étude quantitative révèle qu'il ne ferait pas parti des métabolites majoritaires de la caféine.

Seuls les 4 métabolites majoritaires (théobromine, M₂, paraxanthine et théophylline) ont été considérés pour la suite de notre étude. En effet, nous ne pouvons pas exclure l'éventualité que les 4 autres métabolites de plus faible intensité, observés après 2 heures de consommation de la caféine, soient des métabolites secondaires issus de la dégradation des 4 métabolites principaux.

Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une cinétique sur des lignées contrôles afin de caractériser la dynamique de dégradation de la caféine au cours du temps. De plus, dans notre étude, nous avons choisi d'être en condition saturante de caféine, mais nous pourrions envisager de réduire cette concentration qui nous permettrait peut-être d'observer à la fois la disparition de caféine et l'apparition des métabolites de la caféine.

L'utilisation d'un inhibiteur des CYP en l'occurrence, le métyrapone, nous a permis de mettre en évidence pour la première fois que le métabolisme de la caféine chez les insectes est également CYP-dépendant.

3.3- Implication de *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5* dans le métabolisme de la caféine dans le corps

Par ailleurs, les études de (Kot & Daniel 2007) en particulier montrent que généralement les CYP induits par un xénobiotique participent à son métabolisme. Afin de vérifier si c'est le cas chez la drosophile, nous avons inhibé spécifiquement l'expression de

Discussion / Perspectives: Approche métabolique

CYP12d1, *CYP6a8* et *CYP6d5* dans l'ensemble du corps des individus et analysé leur profil métabolique suite à l'ingestion de caféine.

(i)- La diminution de l'expression de *CYP6d5* ciblée dans l'ensemble du corps entraîne une disparition de la théobromine et une augmentation de la quantité du métabolite M₂. Ces résultats montrent clairement que *CYP6d5* biotransforme la caféine en théobromine. De plus, l'augmentation de la quantité du métabolite M₂ peut refléter une accumulation de M₂ suggérant que *CYP6d5* pourrait être impliqué dans la dégradation du métabolite M₂.

En parallèle, nous avons vérifié le niveau d'expression de *CYP6d5*, *CYP6a8* et *CYP12d1* candidats dans la lignée *CYP6d5* transgénique. Seule l'expression de *CYP6d5* est diminuée indiquant une spécificité d'inhibition de *CYP6d5* chez les individus *CYP6d5* transgéniques. Toutefois, étant donné que seul le niveau d'expression de nos 3 candidats a été mesuré, nous ne pouvons pas exclure que l'expression d'autres CYP soit modulée au sein de ces individus transgéniques.

(ii)- Une diminution de l'expression de *CYP6a8* entraîne une augmentation significative de la quantité de théobromine, du métabolite M₂ et de la paraxanthine suggérant une implication de *CYP6a8* dans la dégradation de ces métabolites principaux. La vérification q-PCR a révélé que seule l'expression de *CYP6a8* était diminuée chez les individus *CYP6a8* transgéniques.

(iii)- Enfin, une diminution de l'expression de *CYP12d1* entraîne cette fois-ci une diminution de la quantité du métabolite M₂ suggérant une implication de *CYP12d1* dans la biotransformation de la caféine en M₂. Cependant, la vérification par RT-q-PCR a montré que chez les individus *CYP12d1* transgéniques, l'expression de *CYP12d1* était diminuée de 70 %, celle de *CYP6a8* augmentée de 400 % par rapport à son niveau basal et celle de *CYP6d5* reste inchangée. Ces variations reflètent peut être un phénomène de compensation transcriptionnelle entre *CYP12d1* et *CYP6a8* reflétant ainsi la complexité du réseau des EMX.

Nous avons constaté que lorsque l'expression de *CYP12d1* diminuait alors celle de *CYP6a8* augmentait, la quantité de M₂ diminuait. Si, comme nous l'avons suggéré précédemment, *CYP6a8* participe à la dégradation du métabolite M₂ alors la quantité de M₂ devrait diminuer, et c'est que nous constatons. Ainsi l'action des enzymes *CYP12d1* et *CYP6a8*

serait complémentaire: *CYP12d1* interviendrait dans la dégradation de la caféine en M₂ et ensuite *CYP6a8* interviendrait pour transformer le métabolite M₂.

Une seconde hypothèse ne peut pas être exclue. Le phénotype observé pourrait être uniquement dû à l'action de *CYP6a8* qui serait sur-exprimé chez les individus *CYP12d1* transgéniques. Afin d'étayer cette hypothèse, il faudrait sélectionner une autre lignée *CYP12d1* transgénique dans laquelle l'expression de *CYP6a8* ne serait pas modulée.

Le schéma ci-dessous récapitule les éventuels rôles fonctionnels de nos CYP candidats dans la dégradation de la caféine:

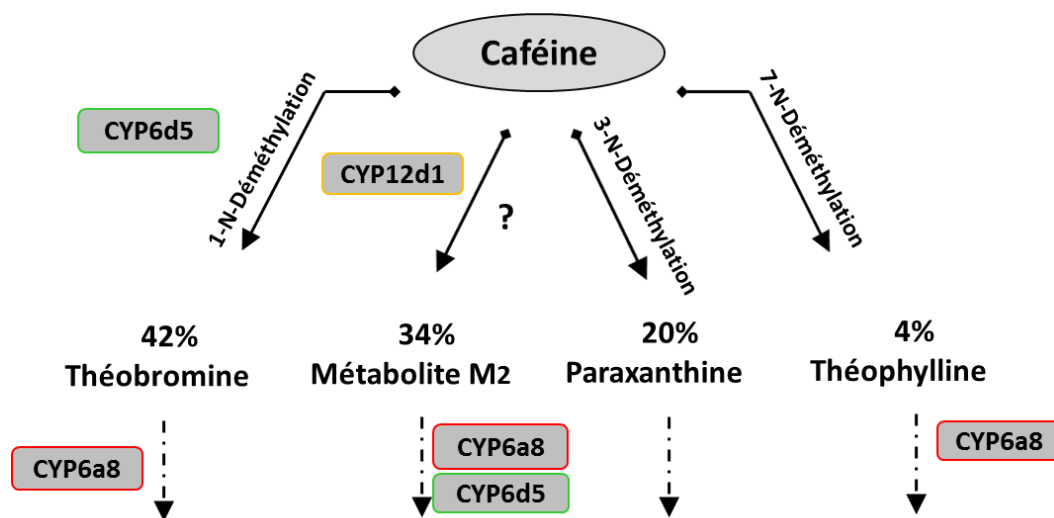


Figure 47: Schéma hypothétique de l'implication des *CYP12d1*, *CYP6a8* et *CYP6d5* dans la voie de dégradation de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

Nos résultats ont montré que la caféine est dégradée par les CYP en 4 métabolites primaires: la théobromine, la paraxanthine, la théophylline et un métabolite non identifié nommé dans notre étude M₂. Plus précisément, nous avons démontré que *CYP6d5* serait responsable de la biotransformation de la caféine en théobromine et participerait également à la dégradation du métabolite M₂. Le candidat *CYP6a8* serait impliqué dans la dégradation des métabolites la théobromine, M₂ et la théophylline. Enfin, *CYP12d1* semblerait impliqué dans la dégradation de la caféine en métabolite M₂.

Notre étude ne nous a pas permis d'identifier des candidats impliqués dans la dégradation de la caféine en paraxanthine et en théophylline. Seuls 3 CYP ont été testés. Cependant nous ne pouvons pas exclure l'intervention d'autres CYP et ou d'autres EMX.

Discussion / Perspectives: Approche métabolique

Nous avons pour la première fois mis en évidence le rôle direct de *CYP6d5* dans la biotransformation de la caféine en théobromine, elle apparaît être une enzyme pivot du métabolisme de la caféine (**Figure 47**).

Chez les mammifères, bien que CYP1A2 catalyse la majorité de la dégradation de la caféine pour chaque réaction de N-déméthylation, d'autres enzymes CYP sont également impliquées (Kot & Daniel 2008b, c). De manière originale, chez la drosophile *CYP6d5* catalyserait à elle seule, la réaction de 1N-déméthylation. Il peut être envisagé d'exprimer *CYP6d5* en cellule hétérologue afin de tester cette activité spécifique.

Dans l'étude des mécanismes de résistance vis-à-vis de la caféine en tant qu'insecticide, les lignées présentant un niveau élevé d'expression de *CYP6d5* et/ou une capacité accrue de synthèse de la théobromine pourraient servir de modèle d'étude. En effet, la spécificité de CYP6D5 en fait une enzyme dont le rôle est critique dans le métabolisme de la caféine et donc dans sa détoxification.

D'autre part, la sélection de lignées présentant une réduction du niveau d'expression ou d'activité spécifique de CYP6D5 pourrait être utilisée pour étudier l'impact physiologique et neurophysiologique de la caféine. En effet, les rôles fonctionnels de la caféine et de la théobromine ont été décrits chez les mammifères. Il serait intéressant d'étudier les effets physiologiques des métabolites de la caféine et notamment, ceux de la théobromine chez les insectes. Il a d'ailleurs été montré que la théobromine présentait des effets moins délétères que la caféine sur la mortalité, la fécondité chez la femelle et sur l'accouplement chez le mâle drosophile (Matsagas *et al.*, 2009)

L'équipe de Montell a montré par des études électrophysiologiques qu'une excision du gène codant Gr66a entraînant une perturbation de la réponse à la caféine, de la paraxanthine. En revanche la détection de la théobromine n'est pas modifiée dans ce contexte génétique (Moon *et al.*, 2006). De plus, il a montré par une étude comportementale qu'une délétion de Gr93a provoquait une perturbation de la perception de la caféine et de la théophylline, en revanche la perception de la paraxanthine et de la théobromine ne semble pas affectée dans ce contexte génétique (Lee *et al.*, 2009). Ces résultats suggéreraient que la théobromine pourrait être détectée par un autre récepteur gustatif sensible aux molécules aversives tel que Gr33a. Dans une certaine mesure, nos résultats apportent quelques éléments de réponse. En effet, après 12 heures d'exposition à la caféine, nous avons observé une induction transcriptionnelle de Gr33a

dans le corps de la drosophile. De plus, nous avons mis en évidence que la théobromine est le métabolite majoritaire de la caféine. Cette induction de Gr33a pourrait être provoquée par la théobromine issue de la dégradation de la caféine dans le corps. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait tester la réponse électrophysiologique d'une lignée GR33a mutante envers la théobromine.

Il existe un intérêt grandissant du modèle drosophile dans l'étude des pathologies et la mise au point de traitements médicamenteux (Pandey & Nichols 2011). Chez l'homme, après ingestion de caféine, l'analyse qualitative et quantitative des métabolites de la caféine permet de préciser le phénotype d'activité des CYP et de CYP1A2 en particulier. Ceci permet d'adapter la posologie d'un traitement dont le métabolisme passe par ces mêmes enzymes. Comme CYP1A2, CYP6D5 semble avoir un rôle critique dans le métabolisme de la caféine. Ainsi, à l'instar de CYP1A2, le dosage des métabolites et de la caféine et de la théobromine en particulier permettrait de définir le phénotype CYP6D5 des lignées de drosophiles pour adapter le traitement à l'étude. Cela implique d'étudier le rôle de CYP6D5 dans le métabolisme des médicaments. On peut noter que le phénobarbital, un médicament de type barbiturique, induit l'expression de *CYP6d5* (Le Goff *et al.*, 2006, Sun *et al.*, 2006).

Enfin, si l'on met en perspective les résultats obtenus pour le métabolisme de la caféine et ceux obtenus concernant le rôle des CYP dans sa perception sensorielle, il apparaît important de vérifier si le métabolisme caractérisé dans le corps est équivalent à celui existant dans les appendices sensoriels. Néanmoins, nous avons montré en réalisant deux études parallèles qu'il y avait une corrélation évidente entre la caractérisation de *CYP6d5* comme enzyme critique du métabolisme de la caféine et le rôle significatif de cette enzyme dans la perception sensorielle de la caféine.

Matériels et Méthodes

Chapitre 8: Matériels et Méthodes

1- Matériels

1.1- Conditions d'élevage des drosophiles

Les drosophiles sont élevées dans une pièce à 25°C avec un cycle de 12h de jour/12h de nuit. Les souches sont entretenues sur un milieu nutritif (1,5% d'agar-agar, 10% de levure de bière, 9% de farine de maïs, 0,4% de para-hydroxy-benzoate de méthyle) assurant le développement des larves et des adultes. Le maintien des souches se fait par repiquage des adultes dans des tubes de milieu frais à chaque génération. A 25°C, une dizaine de jours sépare deux générations, ce qui facilite l'étude rapide de la transmission des caractères héréditaires. De plus, l'ensemble des souches est également maintenu dans une pièce à 18°C, ce qui permet d'allonger le temps de développement des drosophiles à environ 20 jours.

1.2- Les lignées utilisées

Les différentes lignées utilisées ont été obtenues auprès du Bloomington Stock Center et du Vienna Drosophila Resource Center (VDRC). Leur génotype est décrit dans Flybase (<http://flybase.org/>).

1.2.1- Les lignées contrôles

Deux lignées sauvages Canton-S (Cs) et W₁₁₁₈ ont été utilisées en tant que lignées témoins au cours de ce travail. Ces lignées nous ont également servi pour la mise au point des paramètres d'analyse des tests de comportement gustatif.

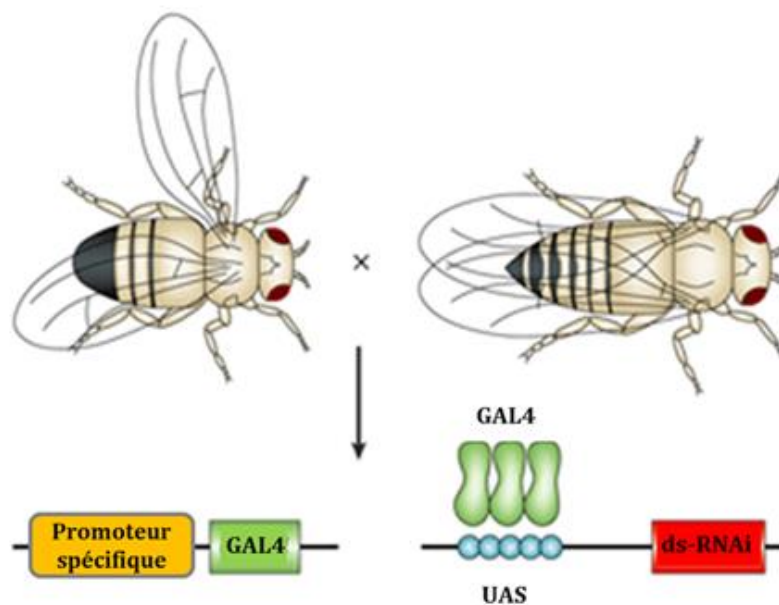


Figure 48: Le Système GAL4/ UAS gène rapporteur.

Des individus porteurs du transgène promoteur tissu-spécifique-GAL4 sont croisés avec des individus porteurs du transgène UAS-gène rapporteur. Les individus issus de ce croisement exprimeront GAL4 dans les cellules où s'exprime le promoteur tissu-spécifique. Le gène rapporteur peut-être par exemple un marqueur fluorescent (GFP) ou un ARN interférent (RNAi).

1.2.2- Les lignées transgéniques

1.2.2.1- Système UAS/GAL4

Le système UAS-GAL4 est une technique qui fait intervenir deux séquences spécifiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, intégrées par mutagenèse dans le génome de la drosophile: (1) le gène *GAL4* codant le facteur de transcription GAL4 et des séquences activatrices contenant des sites de liaison UAS (Upstream Activator Sequence) pour la protéine GAL4. Le gène *GAL4* peut être associé à un promoteur dont l'expression spatio-temporelle est connue. Ainsi, les promoteurs tissus-spécifiques sont capables de diriger l'expression du facteur de transcription GAL4 selon leur propre profil d'expression. Le facteur de transcription GAL4 se fixe aux séquences UAS situées en amont d'un gène rapporteur et entraîne ainsi sa transcription. Le gène rapporteur sera activé uniquement dans les cellules où la protéine GAL4 s'exprime. Une lignée GAL4 choisie pour son patron d'expression peut servir à piloter une multitude de transgènes UAS-rapporteur.

Afin d'obtenir une lignée qui exprime un gène rapporteur de manière tissu-spécifique, il est nécessaire de croiser deux souches transgéniques: la première contient un promoteur tissu ou cellules-spécifique associé au gène *GAL4*, dont le profil d'expression est connu et la seconde renferme un gène rapporteur associé aux séquences UAS. La descendance exprimera le gène rapporteur uniquement au niveau des tissus ou des cellules où s'exprime GAL4. Il est par exemple possible de vérifier le profil d'expression des lignées GAL4 en les croisant avec la lignée transgénique présentant les séquences UAS associées à la molécule fluorescente GFP (green fluorescent protein). Ainsi, les individus issus du croisement entre la lignée driver-GAL4 et UAS-GFP exprimeront la GFP uniquement dans les tissus et cellules où s'exprime la protéine GAL4 et seront visible en fluorescence (**Figure 48**) (Duffy 2002).

1.2.2.2- Lignées transgéniques GAL4 utilisées

Tableau 7: Liste des lignées GAL4 utilisées

Lignées	Génotypes / Allèles	Lignée	Provenance	Expression	Tissus
Actine5C-GAL4	W ⁺ ; P{GAL4-btLS}2, P{UASp-Act5C.T:GFP}2/CyO, P{lacZ-un3}276	8807	Bloomington	Ubiquitaire	Corps entier
Neuralized-GAL4	W ¹¹¹⁸ ; P{GawB}neurGAL4-A101 KgV/TM3, Sb1	6393	Bloomington	Neurones sensoriels	Appendices sensoriels
Elav-GAL4	W ⁺ ; P{GAL4-elav.L}2	8760	Bloomington	Neurones	Proboscis
MB247-GAL4	W ⁺ ; P{Mef2-GAL4.247}3	50742	Bloomington	Mushroom Bodies	Mushroom Bodies
Gr66a-GAL4	W ⁺ ; P{Gr66a-GAL4}2; TM6B/MKRS	28801	K. Scott	Neurones sensoriels	Proboscis Pattes
Gr33a-GAL4	W ⁺ ;Sp/CyO; P{Gr33a-GAL4}3		J. Carlson	Neurones sensoriels	Proboscis Pattes
Cut-GAL4	W ⁺ ; P{cut-GAL4.B}3	27327	Bloomington	Cellules accessoires	Proboscis
Repo-GAL4	W ⁺ ; P{repo-GAL4/TM6B}3	45224	Bloomington	Cellules gliales	Proboscis

1.2.3- Lignées transgéniques UAS ARN interférent utilisées (RNAi)

L'utilisation d'une lignée UAS-dsRNAi couplée avec une lignée driver-GAL4 permet de diminuer le niveau d'expression d'un gène cible dans des tissus ou des organes spécifiques.

Tableau 8: Liste des lignées RNAi utilisées

Gènes	Numéro CG	Lignée	Insertion	Chromosome	Provenance
CYP12d1	CG30489	49271	GD	2	VDRC
CYP12d1	CG30489	109256	KK	2	VDRC
CYP6a8	CG10248	4884	GD	2	VDRC
CYP6a8	CG10248	100459	GD	2	VDRC
CYP6d5	CG3050	12138	GD	2	VDRC
CYP6d5	CG3050	12139	GD	2	VDRC
CYP6d5	CG3050	107641	KK	2	VDRC
CYP4d14	CG3540	14598	GD	3	VDRC
CYP4d14	CG3540	14599	GD	1	VDRC
CYP4d14	CG3540	48318	GD	3	VDRC
CYP4d14	CG3540	48319	GD	2	VDRC
CYP4d1	CG3656	109341	KK	2	VDRC

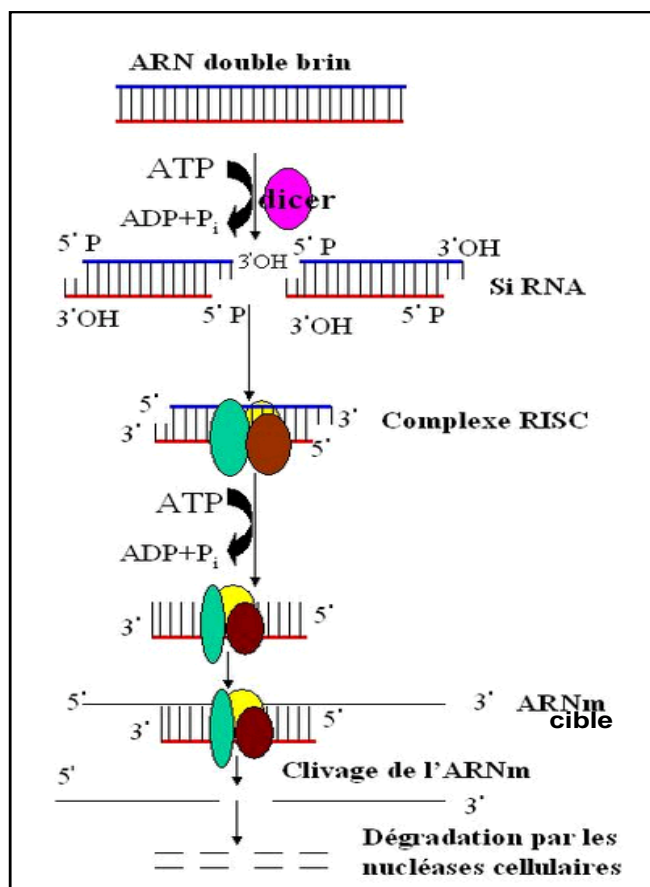


Figure 49: Mécanisme de l'ARN interférence (RNAi).

L'ARN double brin précurseur est clivé en petits fragments de 25pb appelés siRNA. Les siRNA sont pris en charge par le complexe protéique RISC et entraîne le clivage et la dégradation de l'ARN cible. Le RNAi peut ainsi directement inhiber ou rendre silencieux l'expression du gène cible.

1.3- Principe de l'ARN interférent

1.3.1- Génération des siRNA

Le mécanisme d'extinction d'expression de gène est déclenché par l'introduction d'ARN double brin (ARN db) dans la cellule. Les ARN db sont pris en charge par une ribonucléase appelée DICER, qui va cliver les ARN db précurseurs en petits fragments d'ARN db de 21 à 25 pb nommés siRNA (small interfering RNA). Après clivage, les siRNA double brins, fixés à DICER vont s'associer à la protéine Argonaute pour former le complexe multi-protéique RISC actif (RNA-indices silencing complex).

1.3.2- Activation du complexe RISC

Une fois le complexe RISC activé, les deux brins du siRNA sont dissociés et l'une des extrémités 5' de l'ARN reste fixée à la protéine Argonaute, ce brin sera appelé brin guide tandis que le brin complémentaire sera dégradé. Le siRNA simple brin va diriger le complexe RISC vers la séquence de l'ARNm cible. Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est parfaite, alors le complexe RISC va cliver l'ARNm et entraîner sa dégradation empêchant ainsi la traduction de la protéine correspondante (**Figure 49**).

2- Méthodes

2.1- Approche transcriptomique

2.1.1- Exposition à la caféine

Des individus Cs mâles âgés entre 4 et 6 jours ont été mis à jeûner pendant 16 heures à 25°C dans un tube en verre contenant du papier humide. Ensuite, ils ont été transférés sur un milieu d'élevage supplémenté en caféine à une concentration finale de 18mM pendant 24 heures. Après l'exposition, ils ont été anesthésiés sur la glace puis les proboscis ont été disséqués manuellement et l'ensemble des autres appendices sensoriels ont été séparés des corps et récoltés par la méthode de séparation sur un tamis. Les échantillons ont été conservés à -80°C dans 500µL de TRIzol (5 Prime). Quatre conditions ont été réalisées pour cette étude: 3 réplicats biologiques de corps / d'appendices sensoriels traités à la caféine et 3 réplicats biologiques de corps / d'appendices sensoriels non traités à la caféine. Dans le cas des individus non traités à la caféine, le volume de caféine ajouté au milieu nutritif a été remplacé par de l'eau distillée.

2.1.2- Etude transcriptomique

La réalisation et l'analyse de l'étude transcriptomique à partir d'une puce pan-génomique de drosophile ont été confiées à la société Imaxio. Les échantillons d'ARN ont été hybridés sur des lames type Microarray (Drosophile 4 X 44K, Agilent Technologies) selon une approche simple couleur. Cette approche permet une comparaison directe des intensités de fluorescence entre les puces, sans avoir recours à une référence commune. Au préalable, les ARNs ont été dosés au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 et dilués à 180ng/µL en vue du marquage. L'intégrité, la qualité et la pureté des ARN ont été évaluées par un Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies).

Marqués par le kit Low Input Quick Amp labelling kit, one color (Agilent Technologies), les ARNc (ARN marqués à la Cyanine 3) ont été purifiés sur colonne RNeasy Mini kit (Qiagen) et clivés par dénaturation (30 min, 60°C) en fragments d'ARNc de 50 à 200 nucléotides. L'étape de fragmentation des ARNc est essentielle afin d'éviter la mise en place de structures secondaires des transcrits qui peuvent interférer avec l'étape d'hybridation sur puce.

Ensuite, les ARNc marqués à la Cyanine 3 ont été hybridés sur la puce pan-génomique pendant 17 heures à 65°C et les lames ont été scannées (scanner G2505C, Agilent Technologies) et analysées avec le logiciel Feature Extraction 10.1.

Analyses statistiques :

L'étude transcriptomique est définie par deux paramètres (les tissus et le traitement). Les 4 conditions de l'étude pouvant être comparées sont les suivantes:

- (i) Les appendices sensoriels traités à la caféine et (ii) non traités à la caféine.
- (iii) Les corps traités à la caféine et (iv) non traités à la caféine.

Selon la comparaison souhaitée, deux tests statistiques différents ont été utilisés. Les différences significatives d'expression de gènes entre les quatre conditions ont été évaluées par une ANOVA avec les critères suivants: $p\text{-value} < 0.05$ et une correction de Benjamini-Hochberg.

Par contre, les différences significatives d'expression de gènes entre deux conditions ont été évaluées par un test t avec les critères suivants: $p\text{-value} < 0,05$ et une correction de Benjamini-Hochberg.

Pour notre étude, plusieurs gènes candidats, dont l'expression est induite par l'exposition à la caféine dans chaque tissu, ont été sélectionnés avec un facteur d'induction (Cut-off) supérieur à 2 et une p-Value inférieur à 0,05.

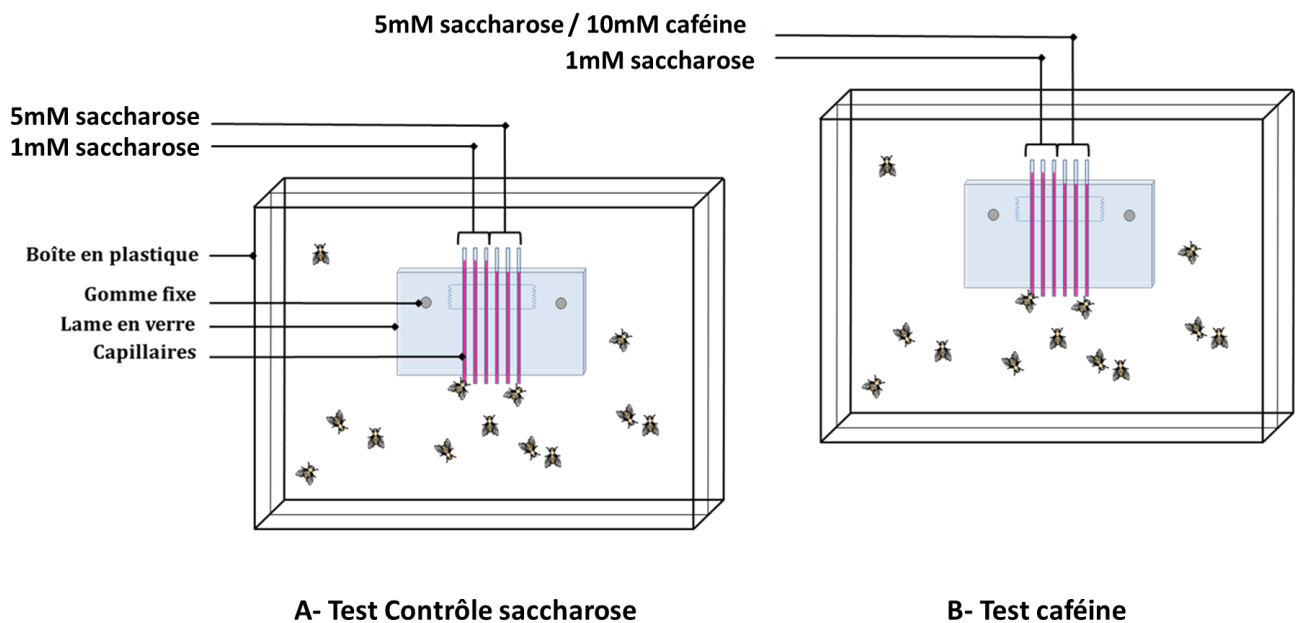


Figure 50: Présentation du dispositif comportemental MultiCAFE.

(A)- Test contrôle saccharose: Les individus testés ont le choix entre deux solutions colorées de saccharose à 1mM et 5mM.

(B)- Test caféine: Dans le cas du test caféine, les individus ont le choix entre une solution de saccharose 1mM et un mélange de saccharose 5mM et caféine 10mM.

Les individus sont testés pendant 2 heures à l'obscurité et un indice de préférence est calculé vis-à-vis du 1mM saccharose à l'issue du test. Modifié à partir de (Sellier *et al.*, 2011).

2.2- Approche comportementale

2.2.1- Tri des individus

A l'émergence, les individus mâles et femelles, anesthésiés au CO₂, sont sexés sous une loupe binoculaire (Leica MZ6), puis groupés en lot de 45 individus dans des tubes contenant du milieu frais. Cinq à sept jours après l'émergence, la capacité des individus à détecter la caféine est évaluée en utilisant des tests comportementaux gustatifs à choix multiple. La veille du test, les individus sont mis à jeûner pendant 18 à 20 heures dans un tube en verre contenant du papier humide.

2.2.2- Test comportemental de gustation MultiCAFE

Le test comportemental de gustation MultiCAFE permet d'évaluer la capacité des individus testés à discriminer deux solutions différentes lorsqu'ils sont confrontés à ce choix (Sellier *et al.*, 2011). De plus, le MultiCAFE permet à la fois de visualiser et de mesurer avec précision le volume consommé de chaque solution.

Les individus de chaque lignée sont sexés et testés entre 5 et 7 jours après l'émergence. Ils sont mis à jeûner pendant 18 à 20 heures à 25°C dans un tube en verre contenant du papier humide la veille du test. Les tests comportementaux sont réalisés dans une pièce à 25°C avec 50% - 60% d'humidité afin de limiter l'évaporation des solutions.

Les individus sont introduits par lot de 35-40 mouches dans une boîte en plastique (Caubere ; Réf 962 dimension 90*60*20) qui contient une lame en verre fixée avec de la patafix (UHU). Au préalable six capillaires, (Fisher Minicaps 5µL Référence 95860) remplis des solutions d'intérêt ont été fixés sur la lame en verre avec du scotch double face (UHU) de manière parallèle, dans le même plan et à égale distance les uns des autres (**Figure 50**). Ensuite, les boîtes sont placées dans une enceinte humidifiée à l'obscurité pendant 2 heures. Afin de faciliter la visualisation de la consommation des différentes solutions, dans chaque capillaire, les deux solutions sont colorées avec un colorant rouge (2mg/mL de sulforhodamine).

Trois capillaires sont remplis d'une solution de saccharose à 1mM et les trois autres capillaires sont remplis avec une solution de saccharose à 5mM dans le cas du **test Contrôle saccharose (Figure 50A)** ou avec un mélange de saccharose à 5mM/caféine à 10mM dans le cas du **test caféine (Figure 50B)**. Les boîtes sont scannées une première fois avant d'introduire les

Matériels & Méthodes

drosophiles à t=0 heure puis à la fin du test à t=2 heures. Une boîte témoin (Evaporation), ne contenant pas de drosophiles, est réalisée à chaque test dans les mêmes conditions afin de mesurer l'évaporation moyenne qui a eu lieu dans chaque capillaire au cours de l'expérience.

Les images sont analysées en utilisant le logiciel Image J qui permet de mesurer le volume moyen consommé de chaque solution dans chaque capillaire. Afin de déterminer avec précision le volume moyen consommé dans les capillaires, il est indispensable de retrancher le volume moyen d'évaporation des solutions dans chaque capillaire.

Ensuite, un indice de préférence pour la solution de saccharose 1mM est calculé pour chaque lignée transgénique et contrôle ainsi que pour chaque test.

Lorsque l'IP calculé est compris entre 0 et 1, il indique une préférence marquée des individus pour la solution de référence : saccharose 1mM. Si l'IP est compris entre -1 et 0, il montre une préférence des individus, d'une part, pour le saccharose 5mM dans le **test contrôle saccharose (Figure 50A)**, et d'autre part, pour le mélange saccharose 5mM/caféine 10mM dans le **test caféine. (Figure 50B)**.

Analyse statistique: Les différences obtenues entre les indices de préférence des lignées mutantes et leurs témoins ont été analysées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (Rcmdr ; version 3.0.2). Les données sont considérées significativement différentes lorsque la p value est inférieure à 0,05 (* p < 0,05).

2.3- Approches en Biologie Moléculaire

2.3.1- Séparation / Dissection des tissus

La séparation des différents tissus (corps, têtes et appendices sensoriels) est effectuée sur des individus âgés de 5 à 7 jours, qui sont placés dans un dispositif contenant un tamis muni d'un maillage suffisamment fin pour ne laisser passer que les appendices (3ème segment antennaire, palpes labiaux, pattes, soies).

Le tamis et les individus sont refroidis grâce à de l'azote liquide permettant la fragilisation des tissus et leur conservation, puis le tout est placé sur un agitateur type vortex pendant 30 secondes afin de séparer les différents tissus par friction mécanique.

Ensuite, le contenu du tamis est transféré dans un autre tamis disposant d'un maillage plus grand, permettant de séparer les têtes des corps. Les tissus sont immédiatement placés dans 500µL de TRIzol (5 Prime) puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Lors de l'utilisation de lignées driver GAL4 dont l'expression est limitée au proboscis et aux pattes prothoraciques, la technique de séparation sur tamis n'a pas pu être réalisée. Les tissus ont alors été disséqués manuellement sur des individus anesthésiés sur la glace. Les nombres de mouches nécessaires pour extraire les ARN de ces tissus pour un réplicat biologique sont les suivantes: entre 10 et 20 pour les corps entiers; entre 100 et 200 pour l'ensemble des appendices sensoriels et entre 80 et 100 pour les proboscis et les pattes prothoraciques.

2.3.2- Extraction d'ARN totaux

Les tissus sont placés dans des microtubes contenant 500µL de TRIzol (5 PRIME) et une bille de tungstène (Tungsten Carbide Beads, 3 mm, Qiagen) et l'ensemble est placé dans le TissueLyser (Qiagen) (2x 30 sec à 30 Hz) afin de lyser l'ensemble des tissus et des cellules. Les échantillons sont, par la suite, incubés à température ambiante pendant 5 minutes afin de permettre une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. Un volume de 50µL de BAN (4-bromoanisole) (Euromedex) est ajouté et l'homogénat est mélangé vigoureusement puis incubé à température ambiante pendant 10 minutes.

Une première centrifugation (12 000 g, 15 min à 4°C) permet la séparation de deux phases: organique et aqueuse. Les phases organique et intermédiaire contiennent le phénol, le chloroforme, les lipides, les protéines ainsi que l'ADN génomique. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont transférés dans un nouveau tube et sont précipités par 250µL d'isopropanol, puis incubés à température ambiante pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés (12 000 g, 10 min à 4°C) et le culot obtenu est lavé deux fois dans 500µL d'éthanol 75° et centrifugé à chaque fois à 7 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est séché à l'air ambiant.

Les ARN totaux issus des corps entiers, du mélange appendices sensoriels / têtes et de la dissection proboscis / pattes prothoraciques sont respectivement repris dans 150µL, 80µL et 12µL d'eau DEPC. La qualité et la quantité des ARN extraits sont déterminées par spectrophotométrie et les échantillons sont conservés à -80°C. La qualité et la quantité des ARN extraits sont déterminées par spectrophotométrie et les échantillons sont conservés à -80°C.

2.3.3- Dosage spectrophotométrique de l'ARN

La concentration des ARN totaux est mesurée par spectrophotométrie. La mesure de la densité optique des échantillons est effectuée à 260 et 280 et 230 nm (1 unité de Densité Optique: 40µg /µL d'ARN). Les ratios 260/280 et 260/230 permettent d'évaluer la pureté des ARN. Les ARN sont considérés comme purs si le ratio DO_{260}/DO_{280} est compris entre 1,8 et 2,0. Au-dessous de cette valeur, les échantillons sont contaminés en protéines. Le ratio DO_{260}/DO_{230} est un indicateur de contaminations phénoliques et doit être supérieur à 2,0. Il est également possible de vérifier la qualité des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

2.3.4- Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique, 2µg d'ARN totaux sont incubés avec la DNase I (RNase free; 1U/µL; Fermentas) pendant 30 minutes à 37°C dans un volume réactionnel de 20µL. La réaction est stoppée par l'ajout de 2µL d'EDTA et incubée pendant 10 minutes à 67°C.

La réaction de transcription inverse consiste en une synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARNm par transcription inverse (Reverse Transcriptase). La rétro-transcription des ARN est réalisée selon le protocole du kit iScript (BioRad). Le mélange réactionnel contient 10µL d'ARN totaux (1µg d'ARN digéré), 4µL du tampon RT (5X) et 1µL d'enzyme Reverse Transcriptase. Le programme de reverse transcriptase est composé de 3 étapes, une première étape de 5 minutes à 25°C, ensuite 30 minutes à 42°C et enfin 5 minutes à 85°C.

2.3.5- PCR en temps réel ou PCR quantitative (q-PCR)

La PCR quantitative (q-PCR) est une méthode *in vitro* qui permet la quantification relative du taux d'expression (ou transcription) d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence. Après une étape de reverse transcription des ARNm en ADNc, une courte séquence nucléotidique spécifique (environ 100pb) est amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible. A l'inverse d'une PCR classique, où l'analyse des résultats se fait par la mesure de la quantité de produit formé après un nombre de cycles prédéfinis, la PCR quantitative permet la détermination d'un cycle seuil (Ct: cycle threshold) pour lequel le produit de PCR atteint une quantité donnée. Pour cela, on utilise un fluorophore (SYBR Green I; BioRad) dont le signal augmente proportionnellement avec la quantité de produit amplifié au cours de la réaction.

Tableau 9: Liste des amorces utilisées en PCR quantitative

Noms	Séquences nucléotidiques (5'-3')	Tm
<i>RP-49 L</i>	CCCAAGGGTATCGACAACAG	60
<i>RP-49 R</i>	GTTCGATCCGTAACCGATGT	60
<i>α Tubuline L</i>	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	60
<i>α Tubuline R</i>	AGCAGTAGAGCTCCCAGCAG	60
<i>CYP4ac1 L</i>	GCCATTCTGGAGATGAAGGT	60
<i>CYP4ac1 R</i>	GGGCAGGAGTTTAAAGTTCCTAAT	60
<i>CYP4ac2 L</i>	CGGTGCCTTTCATTGGAC	60
<i>CYP4ac2 R</i>	GCATGATTAAACCGTTGACCA	60
<i>CYP4d1 L</i>	GCCCTGAACGTGCTTCACCAG	60
<i>CYP4d1R</i>	GTGCTCTTGTCATTGCCACCA	60
<i>CYP4d14 L</i>	TGAGGTTCAAGGCTCGCGTCTTC	60
<i>CYP4d14 R</i>	ATCTCGCCCTTGCGCTCCAT	60
<i>CYP4d20 L</i>	TGGAGATCATGGATCGACATAG	60
<i>CYP4d20 R</i>	CTTACCATCGGCCACCTTT	60
<i>CYP4d21 L</i>	GGAATTATGGTGGAGAAATTGAA	60
<i>CYP4d21 R</i>	GAATAGGTCCACGCACGTTT	60
<i>CYP4p1 L</i>	TCCGACATTCCATTTCAACA	60
<i>CYP4p1 R</i>	AGGAACTTTTGACTCTCCGTTTT	60
<i>CYP6a8 L</i>	GGCTGAGGTGGAGGAGGT	60
<i>CYP6a8 R</i>	CGATGACGAAGTTTGGATGA	60
<i>CYP6a9 L</i>	GGAAAAGTCTCCATTGTCG	60
<i>CYP6a9 R</i>	CGATTACGTCGGTGGTGAAT	60
<i>CYP6a20 L</i>	GTCCTGCCTGCACTTTCCT	60
<i>CYP6a20 R</i>	ATCGAAGACCGATGCAGTTC	60
<i>CYP6d5 L</i>	AAGCAACTGCCTGCGAAC	60
<i>CYP6d5 R</i>	CAATAATGTCGATGGCGTATGT	60
<i>CYP12a5 L</i>	GGCTCAGGGAGGAGGTTATG	60
<i>CYP12a5 L</i>	AAGCTTCCGTAAACTCGGAAT	60
<i>CYP12d1 L</i>	TTAGCTTGTTTCATGTGCC	60
<i>CYP12d1 L</i>	ATTTACGTGGGTCCCGTTC	60
<i>CYP304a1 L</i>	GCGAGGAAATGGGCAAAT	60
<i>CYP304a1 R</i>	GCATTCCGCTGGAAGTGTAT	60
<i>CYP313a1 R</i>	TGTGGACAACATGACCATGAA	60
<i>CYP313a1 L</i>	CCGCGTCGTTGAAGTTTAAG	60

Matériels & Méthodes

Ainsi, au cours de l'étape de PCR, l'incorporation d'un fluorophore permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification néoformé. Par analyse, il est ensuite possible de déterminer le taux relatif d'ARNm cible par rapport à un ARNm témoin (*Actine*, *RP-49*, *Tubuline* et *Cyclophiline*) (**Tableau 10**).

La réaction contient un mélange de 10µL du mix SYBR Green, 5µL du mélange d'ADNc dilué au 1/5^{ème} et 5µL d'un mélange d'amorces à 10µM. L'amplification et la quantification d'un taux de transcrit pour un gène d'intérêt peuvent être visualisées à l'aide du logiciel MyIQ (BioRad). Le programme de q-PCR est composé de six étapes : (1) une étape d'activation de l'enzyme pendant 3 minutes à 98°C, (2) une amplification PCR classique répétée 40 fois ; (2.1) une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, (2.2) une phase d'hybridation de 30 secondes à 60°C puis (2.3) une phase d'extension de 30 secondes à 72°C. Un nouveau cycle de dénaturation d'1 minute à 95°C (4) un cycle d'1 minute à 55°, (5) une étape de 10 secondes à 55°C sur 80 cycles (+0.5°C à chaque cycle) et (6) maintien à 20°C. Au cours de l'étape (5) une courbe de fusion est réalisée ce qui permet de vérifier qu'un seul produit a été amplifié.

Pour chaque condition, trois réplicats biologiques sont utilisés et déposés en duplicata technique, des contrôles négatifs sans ADNc sont également déposés sur la plaque. Pour calculer l'efficacité de la PCR, une gamme de dilution en cascade au 1/10^{ème} est réalisée en 4 points à partir d'un mélange d'ADNc. L'échantillon non dilué est composé d'un mélange en quantité équivalente de tous les ADNc qui sont utilisés pour l'expérience. Une efficacité optimale d'une PCR est une valeur proche de 2.

Un gène de référence est par définition un gène dont l'expression ne varie pas d'une condition à l'autre. Le niveau d'expression du gène d'intérêt est normalisé par le niveau d'expression du gène référence. Le choix des gènes de référence est donc crucial pour l'étude précise du niveau d'expression d'un gène d'intérêt. Des logiciels tels que geNorm et BestKeeper sont disponibles afin de mesurer la stabilité de plusieurs gènes dits de référence. Dans le cadre de notre étude, nous avons sélectionné 4 gènes de référence: *Actine*, *Rp-49*, *Tubuline* et *Cyclophiline*.

Analyse statistique: Pour comparer les niveaux d'expression entre différents échantillons, nous avons utilisé le logiciel Relative Expression Software Tool (REST) en méthode $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl *et al.*, 2002). Ce logiciel permet de comparer deux échantillons par un test de randomisation (nombre

d'itérations fixés à 2000) qui prend en compte la spécificité et l'efficacité des amorces. Un couple d'amorce sera choisi si son efficacité est de l'ordre de 100% avec une marge d'erreur de 10%. Pour le traitement des données, un échantillon ou une condition témoin doit être défini comme référence pour les comparaisons.

2.4- Hybridation *in situ*: synthèse des ribosondes

2.4.1- Extraction d'ADN génomique

Une vingtaine de mouches adultes sont broyées dans 250µL de tampon d'homogénéisation (EDTA 0,1M ; Tris-HCl pH 9 ; SDS 1%) puis le broyat est incubé à 70°C pendant 30 minutes. Après ajout de 35µL d'une solution d'acétate de potassium 8M, le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace, puis centrifugé (15 min, 13000 rpm, 4°C). Afin d'obtenir un surnageant limpide, l'étape suivante est réalisée deux fois.

Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et un volume de 250µL de phénol / chloroforme est ajouté puis le mélange est centrifugé (5 min, 13 000 rpm, 4°C). Il est important de ne pas vortexer le mélange pour préserver l'intégrité de l'ADN.

L'ADN est précipité par 150µL d'isopropanol puis centrifugé (5 min, 10 000 rpm, 4°C). Le culot d'ADN est lavé deux fois à l'éthanol 70° puis centrifugé (5 min, 13 000 rpm, 4°C). Une fois sec, le culot est dissous dans 100µL de Tris-EDTA puis quantifié par spectrophotométrie à 260nm.

Tableau 10: Liste des oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes en hybridation *in situ*

Noms	Séquences nucléotidiques (5'-3')	Tm
<i>CYP6D5 L</i>	CCAAGTGGCCACGATGTGTT	60
<i>CYP6D5 R</i>	CCATTAGCTTCTTGAGTTCCAGCTCCTT	60
<i>CYP12D1 L</i>	CCAATGGCTTGGAACCATGA	60
<i>CYP12D1 R</i>	GTCCGTGAATTTGAAGGGGAACG	60
<i>CYP6A8 L</i>	CCAGCATTTACCCGAACCCTTT	60
<i>CYP6A8 R</i>	GTCCACCTTCAGATAGATTCCGTCTTTCAC	60

2.4.2- Réaction d'amplification en chaîne (PCR)

L'ADN est mélangé au milieu réactionnel (Tris-HCl 20mM pH 8.4 ; KCl 50mM ; MgCl₂ 3mM) additionné des 4 dNTP, des amorces spécifiques et 2U de Taq Polymérase.

L'ADN est dénaturé 5 minutes à 94°C, puis les trois étapes de dénaturation (30 sec, 94°C), d'hybridation des amorces (1 minute, 5 degrés en dessous du T_m des oligonucléotides) et de polymérisation (2 min à 72°C). Ce cycle est répété 30 fois. La réaction s'achève par une étape d'élongation de 10 minutes à 72°C.

2.4.3- Purification de l'insert

L'ADN amplifié par PCR est purifié afin d'éliminer la matrice et les amorces (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Le mélange est filtré par centrifugation sur une colonne qui adsorbe l'ADN à haute force ionique (KI>4 M). Après deux lavages à l'éthanol, l'ADN est élué par 50µL d'eau ultra pure et quantifié par spectrophotométrie (1 unité de DO à 260nm équivaut à 50µg d'ADN/mL).

2.4.4- Ligature

L'insert purifié est ligaturé au vecteur pGEM-T Easy par une T4 DNA ligase (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega) pendant 1 heure à température ambiante selon un ratio molaire insert/vecteur : 3/1. Le mélange réactionnel de 10µL contient 3 U de T4 DNA ligase (3U/µL), 5µL de tampon 2X Rapid Ligation Buffer (Tris-HCl 60mM pH 7,8 ; MgCl₂ 20mM ; DTT 20mM ; ATP 2mM ; polyéthylène glycol 10% (v/v)), 50ng de vecteur pGEM-T Easy et l'insert à liguer.

2.4.5- Transformation bactérienne

Les produits de ligature sont ajoutés à 100µL de cellules compétentes TOP10 et incubés 1h dans la glace. Après un choc thermique (42°C pendant 45 sec), les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes dans 800µL de LB, puis cultivées sur milieu solide (LB/Agar 15g/L ; Ampicilline 100µg/mL) pendant 16 heures à 37°C.

2.4.6- Analyse des sous-clones

Les bactéries recombinantes sont cultivées (16 heures, 37°C, 180 tours/min) dans 5mL de LB additionné d'ampicilline (100µg/mL), puis l'ADN plasmidique des sous clones est extrait et purifié sur une colonne échangeuse d'anions (Nucleospin Plasmid QuickPure, Macherey Nagel). La qualité du sous-clonage est vérifiée par digestion de l'ADN des sous-clones par EcoRI dont les sites de restriction sont de part et d'autre du site d'insertion. Ensuite, l'analyse des fragments de restriction est effectuée par séparation électrophorétique en gel d'agarose 1%. Afin de vérifier l'orientation de l'insert, les clones d'intérêt, ayant intégré les inserts, sont digérés par des enzymes appropriées. Afin de s'assurer de l'intégrité des séquences, les clones (50-100ng) sont séquencés par l'entreprise Eurofins MWG Operon.

2.4.7- Marquage de la sonde ARN (ribosondes)

Le marquage des sondes sens et anti-sens est réalisé par transcription *in vitro* suivant le protocole du kit Roche (Dig RNA labelling kit, Roche). Une fois synthétisées, les ribosondes marquées à la digoxigénine sont dosées par spectrophotométrie à 260 nm et analysées sur gel d'agarose 1%.

2.5- Hybridation *in situ* sur proboscis *in toto*

2.5.1- Préparation des proboscis

Les expériences de localisation par HIS ont été réalisées sur des individus mâles âgés de 5 à 7 jours, exposés au préalable à un milieu nutritif supplémenté en caféine. Après exposition, les individus sont anesthésiés sur la glace et les proboscis sont disséqués manuellement, percés à l'aide d'une minutie et incubés dans une solution de PFA 4% ; Na₂CO₃ 0,1M pH 9,5 ; 0,03% Triton pendant 24 heures à 4°C sous agitation.

L'utilisation d'une minutie pour percer l'extrémité proximale du labellum permet d'améliorer la pénétration du fixateur. Le lendemain, les tissus sont rapidement lavés (3 lavages ; 2 min) avec une solution de PBS 1X ; 0.03% Triton et incubés pendant 10 minutes dans une solution d'HCl 0.2M ; 0.03% Triton sous agitation. Les proboscis sont à nouveau rincés brièvement (3 lavages ; 2 min) dans une solution de PBS 1X ; 1% Triton.

2.5.2- Hybridation *in-situ*

Les proboscis sont immergés dans une solution de pré-hybridation (50% Formamide ; 4X SSC ; 1X Denhardtts ; ARNt (250µg/mL) ; ADN de sperme de saumon dénaturé (250µg/mL) ; 50µg/mL d'héparine ; 0.1% Tween) et placés sous agitation à 55°C pendant au moins 6 heures.

Par la suite, la solution de pré-hybridation est remplacée par une solution d'hybridation (50% Formamide ; 4X SSC ; 1X Denhardtts ; ARNt (250µg/mL) ; ADN de sperme de saumon dénaturé (250µg/mL) ; 50µg/mL d'héparine ; 0.1% Tween ; 5% de sulfate de Dextran) contenant 125ng de la ribosonde préalablement dénaturée 3 minutes à 95°C. L'hybridation est réalisée à 55°C sous agitation pendant au minimum 16 heures.

2.5.3- Immunodétection

A l'issue de l'hybridation, les proboscis sont rincés (4 lavages, 15 min) avec une solution de SSC 0.1X ; 0.03% Triton à 60°C sous agitation. Les tissus sont ensuite incubés dans une solution de blocage (1% Blocking Reagent (TSA-Plus Fluorescein System, PerkinElmer), TBS, 0.03% Triton) pendant 5 heures à 4°C. Les proboscis sont incubés en présence d'un anticorps dirigé contre la digoxigénine couplé à une peroxydase pendant 48 heures à 4°C. L'anticorps anti-digoxigénine permet de détecter les complexes ARNm/ribosondes anti-sens. Une molécule de peroxydase couplée à un anticorps primaire va fixer plusieurs molécules de tyramide couplées à la fluorescéine permettant ainsi une amplification du signal (TSA-Plus Fluorescein System, PerkinElmer). Les proboscis sont rincés au PBT (5 lavages, 15 min) à température ambiante sous agitation. Afin d'amplifier le signal détecté par l'anticorps anti-digoxigénine, les proboscis sont incubés dans la solution contenant les molécules de Tyramide - FITC (Fluorescein-isothiocyanate) (diluée au 1/50 dans le tampon adéquat) pendant 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les proboscis sont à nouveau rincés par du PBT pendant 30 minutes et montés entre lames et lamelles dans le milieu de montage Vectashield H-1200 avec DAPI (Vector).

La technique d'hybridation *in situ* utilisée dans notre étude a été développée et mise au point à partir du protocole d'hybridation *in situ* sur antenne *in toto* de l'étude réalisée chez le moustique *Anopheles gambiae* (Schultze *et al.*, 2013). Les images ont été réalisées grâce à un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 AOBS (laser Arg, HeNe et Diode 405nm) et du logiciel Leica Confocal Software.

2.6- Immunohistochimie

2.6.1- Production et Test de l'anticorps anti-CYP6D5

Le programme de production et de purification des anticorps polyclonaux anti-CYP6D5 a été confié à la société Proteogenix. A partir de la séquence protéique de l'enzyme CYP6D5 de la drosophile, deux régions spécifiques, dites immunogènes, ont été sélectionnées pour la synthèse de peptides.

Les séquences ainsi que les positions des deux peptides sont les suivantes: KGKRSFGMAIYDMYK-cys (47-61) et cys- LAYKPERYLENGKDYT (424-439). L'ajout d'une cystéine au peptide est indispensable pour le couplage à la protéine Keyhole Limpet Hemocyanin qui sert à la purification sur colonne d'affinité.

Deux lapins (New Zealand White) sont immunisés deux fois avec le mélange de peptides de synthèse (Jour 0 et Jour 49) avant d'être sacrifiés au 88^{ème} jour. Avant les injections, des prélèvements sont effectués afin de réaliser des tests sur les sera pré-immuns et immuns pour déterminer les titres (ELISA) et pour détecter une activité due à la présence des nouveaux anticorps polyclonaux.

Ces deux anticorps ont été testés en immunohistochimie sur proboscis afin de sélectionner l'anticorps le plus efficace et la dilution à utiliser pour obtenir un signal optimal.

2.6.2- Traitement des tissus

Les expériences de localisation par immunohistochimie ont été réalisées sur des individus mâles âgés de 5 à 7 jours et exposés au préalable à un milieu nutritif supplémenté en caféine. Après l'exposition, les individus sont anesthésiés sur la glace et les proboscis sont disséqués manuellement et percés à l'aide d'une minutie dans une solution de PBS 1X ; 0.2% Triton. Les tissus sont fixés dans une solution de PFA 4% ; PBS 1X ; 1% Triton pendant 45 minutes à température ambiante et sous agitation. L'utilisation d'une minutie pour percer l'extrémité basale du labellum permet d'améliorer la pénétration du fixateur. Les proboscis sont rincés (5 lavages, 15 min) avec du PBS 1X ; 0.2% Triton à température ambiante, puis incubés avec une solution de blocage (0.5% Blocking Reagent ; NaCl 0.15M ; Tris HCl 0.1M pH 7.5) pendant 45 minutes sous agitation.

2.6.3- Immunodétection

Les proboscis sont incubés avec différents anticorps primaires dilués dans une solution PBS 1X ; 0.2% Saponine pendant 48 heures à 4°C. Les proboscis sont rincés (5 lavages, 15 min) avec une solution de PBT et incubés pendant 2 heures avec les anticorps secondaires adéquats à l'obscurité et sous agitation.

Rincés (5 lavages, 15 min) avec une solution de PBT, les proboscis sont montés entre lames et lamelles dans un milieu de montage Vectashield H-1200 avec DAPI (Vector). Les images ont été réalisées grâce à un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 AOBS (laser Arg, HeNe et Diode 405 nm) et du logiciel Leica Confocal Software.

Tableau 11: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunocytochimie

Anticorps pour Immunohistochimie			
	Noms	Dilution	Origine
Anticorps primaires	Anti-CYP6D5 (lapin)	1/1 000	Proteogenix
	Anti- digoxigénine-POD (mouton)	1/500	Roche
	Anti-GFP (chèvre)	1/500	Rockland
	Anti-Elav (rat)	1/500	DSHB
	Anti- Repo (souris)	1/10	DSHB
Anticorps secondaires	Anti-lapin Alexa 488	1/ 400	Molecular Probes
	Anti-chèvre Alexa 488	1/ 400	Molecular Probes
	Anti-rat alexa 594	1/ 400	Molecular Probes
	Anti-souris 594	1/ 400	Molecular Probes

2.7- Biochimie

2.7.1- Extraction de protéines

Les proboscis d'une centaine d'individus mâles âgés entre 4 et 7 jours, anesthésiés sur la glace, sont disséqués manuellement et stockés dans 100µL de tampon de lyse dénaturant (Tris 0.1M pH 6.8 ; 0.1% SDS ; 20% Glycérol ; 2% Inhibiteur de protéase). Les Tissus sont broyés à l'aide du TissueLyser (2X 30 sec, 30Hz) et sont centrifugés (12 000 g, 2 min, 4°C). L'extrait de protéines contenu dans le surnageant est transféré dans un nouveau tube et stocké à - 20°C.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (DC Prot Assay, BioRad) à 595nm avec une gamme de BSA (Bovine sérum albumine) allant de 0mg/mL à 4mg/mL.

Le dosage de protéine est validé lorsque le coefficient de variation de la droite de calibration est inférieur à 10%.

2.7.2- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons (40µg) supplémentés en tampon de charge Laemmli (Biorad) (v/v) et en β - mercaptoéthanol (2.5%) sont incubés pendant 5 minutes à 95°C et sont déposés dans des gels de polyacrylamide pré-coulés à gradient 4% - 15% (Mini-PROTEAN, BioRad).

La migration se fait dans un tampon de migration (1% SDS ; 14,4% Glycine, 3% Tris) pendant 25 minutes à 200 V.

Tableau 12: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot

Anticorps pour Western-Blot			
	Noms	Dilution	Origine
Anticorps primaires	Anti-CYP6D5 (lapin)	1/5 000	Proteogenix
	Anti-Actine (souris)	1/ 200	DSHB
Anticorps secondaires	Anti-Lapin AP	1/15 000	Sigma
	Anti-Souris AP	1/10 000	Sigma

2.7.3- Western-Blot

2.7.3.1- Transfert semi-sec et Coloration rouge Ponceau

Le gel est ensuite transféré en condition « semi-sec » sur une membrane de nitrocellulose (0.45µm) pendant 25 minutes à 20 V.

Afin de valider la qualité du transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose (Biorad) est colorée au rouge Ponceau (0.2% Rouge ponceau ; 3% Acide trichloroacétique ; 3% Acide sulfosalicylique) (Sigma) puis décolorée rapidement à l'eau distillée. Si le transfert est efficace, les bandes correspondant aux protéines sont visibles sur la membrane. La membrane est ensuite incubée dans une solution de blocage (Régilait 5% dilué dans PBS) pendant 4 heures minimum sous agitation.

2.7.3.2- Immunodétection

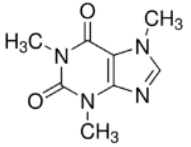
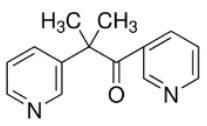
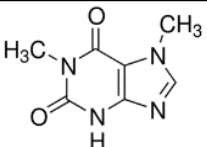
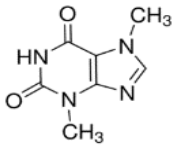
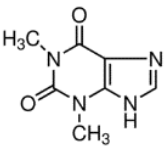
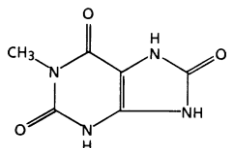
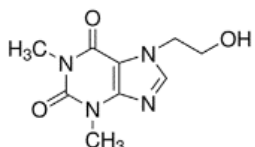
La membrane est incubée pendant une nuit, sous agitation, à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de Régilait 0,1%. Après 5 rinçages de 15 minutes au TBS-T (150mM NaCl ; 20mM Tris ; 1% Tween), la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation.

Après 5 rinçages de 15 minutes à température ambiante, la membrane est incubée dans le tampon de révélation de la phosphatase alcaline (Tris 0,1M pH 9,5 ; NaCl 0,1M ; MgCl₂ 0,05M) puis incubée avec les substrats de l'AP: 34% NBT [nitro-blue tetrazolium] et 17.5% BCIP [5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate] à l'abri de la lumière jusqu'à ce que les bandes d'intérêt apparaissent. La réaction est stoppée à l'ajout du tampon d'arrêt (PBS 1X ; EDTA 20mM).

2.8- Métabolisme de la caféine: Approche en spectrométrie de masse

2.8.1- Produits chimiques

Tableau 13: Liste des métabolites standards utilisés

Molécule	N°CAS	Masse molaire (g / mol)	Fourisseur	Formule chimique
Caféine	58-08-2	194.19	Sigma-Aldrich	
Métyrapone	54-36-4	226.27	Sigma-Aldrich	
Paraxanthine	611-59-6	180.16	Sigma-Aldrich	
Théobromine	83-67-0	180.16	Sigma-Aldrich	
Théophylline	58-55-9	180.16	Sigma-Aldrich	
Acide 1.3.7 triméthylurique	5415-44-1	210.19	Santa Cruz	
7-β-Hydroxyéthyl-Théophylline	519-37-9	224.22	Sigma-Aldrich	

2.8.2- Exposition des individus à la caféine

Les individus mâles et femelles sont exposés à un mélange saccharose 100mM / caféine 20mM en adaptant le dispositif du test comportemental MultiCAFE. A l'issu du test, les individus ayant l'abdomen rouge sont triés et groupés par lots de 100 individus (50 mâles, 50 femelles). Cette première sélection constitue un réplicat comportemental.

2.8.3- Préparation des échantillons

Les réplicats comportementaux de 100 individus sont homogénéisés dans 650µL de Tampon potassium 100mM à pH 7.5 au TissueLyser (4 broyages, 30 sec, 30 Hz) puis centrifugés (14 000 rpm, 15 min, 4°C) afin d'éliminer un maximum des débris cuticulaires. Les surnageants de 3 réplicats comportementaux sont ensuite regroupés pour constituer un réplicat «Métabolisme HPLC».

Après deux centrifugations à (14 000 rpm, 15 min, 4°C) et (14 000 rpm, 5 min, 4°C) chacune, un volume de 1.5 mL de surnageant est récupéré pour chaque échantillon «Métabolisme HPLC». L'ajout de 30µL d'étalon interne 7-β-Hydroxyéthyl-théophylline à 50mg/L (Sigma) permet de standardiser tous nos échantillons qui vont par la suite subir une étape d'extraction et rendre compte du rendement de l'expérience. Les échantillons sont rapidement vortexés puis 150µL d'acétonitrile glacial sont ajoutés pour précipiter les protéines et stopper toutes les réactions de métabolisme enzymatiques.

Après une centrifugation (14 000 rpm, 10 min, 4°C), la caféine et ses métabolites contenu dans le surnageant vont être concentrés par une étape d'extraction liquide/ liquide à l'éthyle acétate / propan-2-ol (8/1 v/v). Le mélange de 15mL est vigoureusement agité pendant 10 minutes à 4°C puis centrifugés (2 500 g, 10 min, 4°C). Les surnageants sont récupérés et transférés dans des tubes coniques puis placés dans un bain-marie à 50°C et évaporés sous flux d'azote. Le culot est repris dans 100µL de la phase mobile (8% méthanol, 92% eau ultra pure) pour être à une concentration finale en étalon interne de 15µg/mL.

2.8.4- Séparation et analyse des métabolites de la caféine par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'ensemble des expériences de métabolisme en HPLC et spectrométrie de masse ont été conduites en collaboration avec la plate-forme ChemoSens (CSGA, Dijon).

L'étude du métabolisme de la caféine a été réalisée sur une chaîne HPLC Dionex UltiMate™ 3000 LC intégralement pilotés par le logiciel Chromeleon®. La phase stationnaire de la colonne utilisée pour la séparation des composés étudiés est de type C18 Hypersil Gold (Thermo) de 15cm x 2.1mm, greffée avec des particules de 3µm de silice. La phase mobile est constituée d'un mélange contenant 8% de méthanol et 92% d'eau ultra pure et une seringue d'injection prélève 10µL d'échantillon (10µg/mL) et l'injecte dans la colonne. La colonne est maintenue à 40°C et le débit isocratique du solvant est de 0.3mL/min pendant un run de 25 minutes.

2.8.5- Analyse du métabolisme de la caféine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Un spectromètre de masse Quantum TSQ à triple quadrupôles (Thermo), équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI, mode ionisation positif, 4 000kV, 350°C) a été utilisé pour l'identification des métabolites de la caféine chez la drosophile. L'azote est utilisé comme gaz pour l'évaporation et la nébulisation. L'appareil est équipé de deux analyseurs couplés, de type triple quadrupôles. La fragmentation est réalisée avec de l'argon à une pression de 1.5mTor et l'énergie de collision est de 15V. L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo). Le ratio masse / charge de chaque métabolite (caféine, théobromine, théophylline et paraxanthine) (Sigma) a été déterminé et optimisé dans ces conditions. Afin de quantifier les différents métabolites de la caféine dans les échantillons, une gamme étalon est effectuée en début et fin d'analyse Cette gamme étalon est constituée d'un mélange des métabolites en concentration croissante (0.01 à 20µg/mL) et une quantité fixe d'étalon interne (7-β-hydroxyéthyl-théophylline, 10µg/mL).

Analyse statistique: Les différences obtenues pour les quantités de chaque métabolite entre les lignées mutantes et leurs témoins ont été analysées avec les tests paramétriques suivant : (plusieurs facteurs) ANOVA et (deux facteurs) test de Student en conditions indépendantes. (R

[Rcmdr] ; version 3.0.2). Les données sont considérées significativement différentes lorsque la p value est inférieure à 0.05 (* $p < 0,05$).

2.9- Métabolisme de la caféine: Approche en chromatographie sur couche mince

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants, elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince (CCM) est constituée de deux variables: la phase stationnaire solide sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant. Le mélange à séparer est déposé sur la phase fixe qui est ensuite mis en contact avec la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. Ce phénomène d'élution permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal. Dans le cas de notre étude, la technique de chromatographie sur couche mince (CCM) est utilisée en vue de séparer et d'analyser les différents métabolites de la caféine.

2.9.1- Traitement des individus

Les individus mâles et femelles âgés de 4 à 7 jours, mis à jeunés au préalable pendant 12 heures dans un tube en verre contenant un papier humide, sont exposés sur un milieu nutritif supplémenté en caféine à 18mM pendant 20 heures afin d'activer le système d'enzymes de détoxification. Suite à l'exposition, les individus sont à nouveau transférés dans leur tube de jeûne pendant 3 heures.

Les individus sont à nouveau exposés, cette fois-ci à la caféine radiomarquée (8- ^{14}C , Biotrend) en adaptant le dispositif du test comportemental MultiCAFE. Au cours de ce test, les individus ont à leur disposition 4 capillaires contenant un mélange de saccharose 100mM et 20 μL de caféine radiomarquée ^{14}C (Concentration 0.1mCi/mL, Activité 52.1mCi/mmol). Afin de visualiser les individus ayant consommé le mélange d'intérêt, la solution est colorée avec un colorant rouge (2mg/mL de sulforhodamine). Les boîtes sont placées à l'abri de la lumière, dans une enceinte humide située dans une chambre d'incubation à 25°C pendant 2 heures.

2.9.2- Préparation des échantillons

Les individus ayant un abdomen rouge, attestant de leur consommation, sont triés, regroupés par lot de 50 individus et homogénéisés dans 150µL de tampon de lyse dénaturant (Tris 0.1M ; 0.1% SDS ; 20% Glycérol ; 10% Inhibiteur de protéase) au piston pellet. Après deux centrifugations (7 000 rpm, 5 min), un surnageant exempt de débris cuticulaires est recueilli puis dosé au compteur à scintillation.

2.9.3- Comptage et dépôt sur plaque de silice

Afin de déterminer la quantité de radioactivité de chaque échantillon, 5µL de surnageant sont mélangés à 5mL de liquide scintillant puis quantifiés dans un compteur à scintillation (Tri-Carb 3110TR, PerkinElmer).

Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 150 000 dpm de radioactivité est déposé sur une plaque en verre couverte de silice greffée des particules de NH₂ (Nano-SIL NH₂/UV, Macherey et Nagel) optimisées pour la séparation des xanthines. Ces plaques sont issues d'une nouvelle génération de plaque de CCM en silice. Elles sont plus hydrophiles et la greffe de groupements amines leur confère un avantage certain. Ce revêtement chimiquement neutre est aussi efficace humidifié par l'eau ou les solvants organiques. Ces plaques présentent également un indicateur fluorescent.

Les dépôts sont alignés à 2cm du bord de la plaque en verre, puis séchés pendant quelques minutes sous la hôte. Sur chaque plaque, une quantité de caféine radiomarquée correspondant à 150000 dpm (si besoin diluée dans le tampon d'homogénéisation) est déposée en tant que dépôt contrôle.

La phase mobile est composée d'un mélange de Chloroforme, Dichlorométhane et d'Isopropanol en proportion (4 / 2 / 1) (v / v / v). Le bas de la plaque est placé dans la cuve afin que la phase mobile pénètre dans la silice par capillarité et sépare les métabolites de caféine contenus dans les dépôts selon leur polarité et leur affinité avec la phase mobile.

La migration est arrêtée lorsque la phase mobile a atteint 1 à 2cm du haut de la plaque et une encoche est faite dans la silice pour marquer le front de migration. La plaque est sortie de la cuve puis séchée quelques minutes sous la hôte et est recouverte de film plastique (Saran).

2.9.4- Exposition

La plaque en silice est ensuite placée dans une cassette d'exposition (Kodac) avec un film photographique (Kodac BioMax MR Film 18 *24cm ; Sigma) et placée à -80°C pendant 2 semaines.

2.9.5- Révélation et analyse des films photographiques

Le film est révélé en chambre noire dans un bain de révélateur (Developer HC-110 Kodac Professional, dilué au 1/16^{ème} dans l'eau distillée, Sigma) jusqu'à apparition des bandes. Le film est ensuite rincé à l'eau puis fixé (Fixateur Kodac Professional Polymax RT dilué au 1/4^{ème} dans l'eau distillé, Sigma).

Les films sont scannés et analysés avec le logiciel Image J 1.47. Pour chaque bande deux paramètres sont calculés. (1) Un rapport frontal calculé selon la formule suivante: $Rf = h / H$ où h est la distance parcourue par la molécule d'intérêt et H la distance parcourue par la phase mobile et (2) l'intensité de la bande exprimée en unité d'aire sous la courbe. L'aire sous la courbe de chaque composé sera rapporté à l'aire sous la courbe de la caféine afin d'établir un ratio pour chaque métabolite.

Analyse statistique: Pour chaque métabolites, les différences obtenues pour les ratios d'aire entre les lignées mutantes et leurs témoins ont été analysées avec les tests paramétriques suivant : (plusieurs facteurs) ANOVA et (deux facteurs) test de Student en conditions indépendantes. (R [Rcmdr] ; version 3.0.2). Les données sont considérées significativement différentes lorsque la p value est inférieure à 0.05 (* $p < 0,05$).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahmad S, Kirkland KE, Blomquist GJ. 1987. Evidence for a sex pheromone metabolizing cytochrome P-450 mono-oxygenase in the housefly. *Archives of insect biochemistry and physiology* 6: 121-40
- Al-Anzi B, Tracey WD, Jr., Benzer S. 2006. Response of *Drosophila* to wasabi is mediated by painless, the fly homolog of mammalian TRPA1/ANKTM1. *Current biology : CB* 16: 1034-40
- Aldridge A, Aranda JV, Neims AH. 1979. Caffeine metabolism in the newborn. *Clinical pharmacology and therapeutics* 25: 447-53
- Aldridge A, Bailey J, Neims AH. 1981. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Seminars in perinatology* 5: 310-4
- Amrein H, Thorne N. 2005. Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current biology : CB* 15: R673-84
- Anaya AL, Cruz-Ortega R, Waller GR. 2006. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11: 2354-70
- Andretic R, Kim YC, Jones FS, Han KA, Greenspan RJ. 2008. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20392-7
- Angelucci ME, Cesario C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. 2002. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 35: 1201-8
- Arendash GW, Cao C. 2010. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 20 Suppl 1: S117-26
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, et al. 2006. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142: 941-52
- Arnaud MJ. 1987. The pharmacology of caffeine. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* 31: 273-313
- Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Kawachi I, Colditz GA, et al. 2001. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Annals of neurology* 50: 56-63
- Ashihara H, Crozier A. 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in plant science* 6: 407-13
- Ashihara H, Sano H, Crozier A. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69: 841-56
- Ashihara H, Suzuki T. 2004. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9: 1864-76
- Astrup A, Breum L, Toubro S, Hein P, Quaade F. 1992a. The effect and safety of an ephedrine/caffeine compound compared to ephedrine, caffeine and placebo in obese subjects on an energy restricted diet. A double blind trial. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 16: 269-77
- Astrup A, Buemann B, Christensen NJ, Toubro S, Thorbek G, et al. 1992b. The effect of ephedrine/caffeine mixture on energy expenditure and body composition in obese women. *Metabolism: clinical and experimental* 41: 686-8

- Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J. 1990. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *The American journal of clinical nutrition* 51: 759-67
- Benckekroun Y, Dautraix S, Desage M, Brazier JL. 1997. Isotopic effects on retention times of caffeine and its metabolites 1,3,7-trimethyluric acid, theophylline, theobromine and paraxanthine. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 688: 245-54
- Benton R. 2009. Eppendorf winner. Evolution and revolution in odor detection. *Science* 326: 382-3
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. *PLoS biology* 4: e20
- Benton R, Vannice KS, Vosshall LB. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in Drosophila. *Nature* 450: 289-93
- Berge JB, Feyereisen R, Amichot M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 353: 1701-5
- Berkowitz BA, Spector S. 1971. The effect of caffeine and theophylline on the disposition of brain serotonin in the rat. *European journal of pharmacology* 16: 322-5
- Berthou F, Flinois JP, Ratanasavanh D, Beaune P, Riche C, Guillouzo A. 1991. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 19: 561-7
- Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacqz-Aigrain E, Beaune PH. 1992. Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 22: 671-80
- Bhaskara S, Chandrasekharan MB, Ganguly R. 2008. Caffeine induction of Cyp6a2 and Cyp6a8 genes of Drosophila melanogaster is modulated by cAMP and D-JUN protein levels. *Gene* 415: 49-59
- Bhaskara S, Dean ED, Lam V, Ganguly R. 2006. Induction of two cytochrome P450 genes, Cyp6a2 and Cyp6a8, of Drosophila melanogaster by caffeine in adult flies and in cell culture. *Gene* 377: 56-64
- Bienvenu T, Pons G, Rey E, Thiroux G, Olive G. 1993. Caffeine metabolism in liver slices during postnatal development in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 21: 178-80
- Blanchard J, Sawers SJ. 1983. The absolute bioavailability of caffeine in man. *European journal of clinical pharmacology* 24: 93-8
- Bock KW. 2003. Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochemical pharmacology* 66: 691-6
- Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S. 1982. Caffeine disposition after oral doses. *Clinical pharmacology and therapeutics* 32: 98-106
- Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF, Garattini S. 1984. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug metabolism reviews* 15: 1355-83

Références bibliographiques

- Bond JA, Harkema JR, Russell VI. 1988. Regional distribution of xenobiotic metabolizing enzymes in respiratory airways of dogs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 16: 116-24
- Bozzolan F, Siaussat D, Maria A, Durand N, Pottier MA, et al. 2014. Antennal uridine diphosphate (UDP)-glycosyltransferases in a pest insect: diversity and putative function in odorant and xenobiotics clearance. *Insect molecular biology*
- Bray S, Amrein H. 2003. A putative *Drosophila* pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron* 39: 1019-29
- Bredendiek N, Hutte J, Steingraber A, Hatt H, Gisselmann G, Neuhaus EM. 2011. Go alpha is involved in sugar perception in *Drosophila*. *Chemical senses* 36: 69-81
- Brice CF, Smith AP. 2002. Effects of caffeine on mood and performance: a study of realistic consumption. *Psychopharmacology* 164: 188-92
- Brown DD, Knowlton RG, Sullivan JJ, Sanjabi PB. 1991. Effect of caffeine ingestion on alveolar ventilation during moderate exercise. *Aviation, space, and environmental medicine* 62: 860-4
- Burg AW. 1975. Physiological disposition of caffeine. *Drug metabolism reviews* 4: 199-228
- Byers D, Davis RL, Kiger JA, Jr. 1981. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289: 79-81
- Cameron P, Hiroi M, Ngai J, Scott K. 2010. The molecular basis for water taste in *Drosophila*. *Nature* 465: 91-5
- Charlu S, Wisotsky Z, Medina A, Dahanukar A. 2013. Acid sensing by sweet and bitter taste neurons in *Drosophila melanogaster*. *Nature communications* 4: 2042
- Chatzigeorgiou M, Bang S, Hwang SW, Schafer WR. 2013. tmc-1 encodes a sodium-sensitive channel required for salt chemosensation in *C. elegans*. *Nature* 494: 95-9
- Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, et al. 2001. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: RC143
- Chertemps T, Francois A, Durand N, Rosell G, Dekker T, et al. 2012. A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC biology* 10: 56
- Chou C-H, Waller GR. 1980. Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. *Journal of chemical ecology* 6: 643-54
- Chou TM, Benowitz NL. 1994. Caffeine and coffee: effects on health and cardiovascular disease. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 109: 173-89
- Chung H, Sztal T, Pasricha S, Sridhar M, Batterham P, Daborn PJ. 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5731-6
- Clyne PJ, Warr CG, Carlson JR. 2000. Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* 287: 1830-4
- Daborn P, Boundy S, Yen J, Pittendrigh B, ffrench-Constant R. 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance

- to the neonicotinoid imidacloprid. *Molecular genetics and genomics : MGG* 266: 556-63
- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, Ffrench-Constant RH, Batterham P. 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect biochemistry and molecular biology* 37: 512-9
- Daborn PJ, Lumb C, Harrop TW, Blasetti A, Pasricha S, et al. 2012. Using *Drosophila melanogaster* to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests. *Insect biochemistry and molecular biology* 42: 918-24
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, et al. 2002. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-6
- Dahanukar A, Foster K, van der Goes van Naters WM, Carlson JR. 2001. A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nature neuroscience* 4: 1182-6
- Dahanukar A, Hallem EA, Carlson JR. 2005. Insect chemoreception. *Current opinion in neurobiology* 15: 423-30
- Dahanukar A, Lei YT, Kwon JY, Carlson JR. 2007. Two Gr genes underlie sugar reception in *Drosophila*. *Neuron* 56: 503-16
- Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. 2003. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *British journal of pharmacology* 138: 1207-9
- Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. 1983. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cellular and molecular neurobiology* 3: 69-80
- Derry CJ, Derry S, Moore RA. 2012. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. *The Cochrane database of systematic reviews* 3: CD009281
- Devambez I, Ali Agha M, Mitri C, Bockaert J, Parmentier ML, et al. 2013. Galphao is required for L-canavanine detection in *Drosophila*. *PloS one* 8: e63484
- Dolezelova E, Nothacker HP, Civelli O, Bryant PJ, Zurovec M. 2007. A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect biochemistry and molecular biology* 37: 318-29
- Duan L, Yang J, Slaughter MM. 2009. Caffeine inhibition of ionotropic glycine receptors. *The Journal of physiology* 587: 4063-75
- Duffy JB. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15
- Dunipace L, Meister S, McNealy C, Amrein H. 2001. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Current biology : CB* 11: 822-35
- Dunwiddie TV, Fredholm BB. 1985. Adenosine modulation of synaptic responses in rat hippocampus: possible role of inhibition or activation of adenylate cyclase. *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research* 19: 259-72
- Durand N, Carot-Sans G, Bozzolan F, Rosell G, Siaussat D, et al. 2011. Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PloS one* 6: e29147

Références bibliographiques

- Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Bozzolan F, Party V, et al. 2010. Characterization of an antennal carboxylesterase from the pest moth *Spodoptera littoralis* degrading a host plant odorant. *PloS one* 5: e15026
- Durand N, Chertemps T, Maibeche-Coisne M. 2012. Antennal carboxylesterases in a moth, structural and functional diversity. *Communicative & integrative biology* 5: 284-6
- Ebbs ML, Amrein H. 2007. Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454: 735-47
- Eskelinen MH, Kivipelto M. 2010. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 20 Suppl 1: S167-74
- Fernandes FL, Picanco MC, Fernandes ME, Queiroz RB, Xavier VM, Martinez HE. 2012. The effects of nutrients and secondary compounds of *Coffea arabica* on the behavior and development of *Coccus viridis*. *Environmental entomology* 41: 333-41
- Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology* 44: 507-33
- Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society transactions* 34: 1252-5
- Fischler W, Kong P, Marella S, Scott K. 2007. The detection of carbonation by the *Drosophila* gustatory system. *Nature* 448: 1054-7
- Folkers E, Spatz H-C. 1984a. Visual learning performance of *Drosophila melanogaster* is altered by neuropharmaca affecting phosphodiesterase activity and acetylcholine transmission. *Journal of insect physiology* 30: 957-65
- Folkers E, Spatz H-C. 1984b. Visual learning performance of *Drosophila melanogaster* is altered by neuropharmaca affecting phosphodiesterase activity and acetylcholine transmission. *Journal of insect physiology* 30: 957-65
- Fredholm BB. 1984a. Cardiovascular and renal actions of methylxanthines. *Progress in clinical and biological research* 158: 303-30
- Fredholm BB. 1984b. Effects of methylxanthines on skeletal muscle and on respiration. *Progress in clinical and biological research* 158: 365-75
- Fredholm BB. 1984c. Gastrointestinal and metabolic effects of methylxanthines. *Progress in clinical and biological research* 158: 331-54
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews* 51: 83-133
- Fujii S, Toyama A, Amrein H. 2008. A male-specific fatty acid omega-hydroxylase, SXE1, is necessary for efficient male mating in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180: 179-90
- Galindo K, Smith DP. 2001. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics* 159: 1059-72
- Getchell TV, Margolis FL, Getchell ML. 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog Neurobiol* 23: 317-45
- Gilbert LI. 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular endocrinology* 215: 1-10

- Giraud M, Unnithan GC, Le Goff G, Feyereisen R. 2010. Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. *Pesticide biochemistry and physiology* 97: 115-22
- Glendinning JI, Brown H, Capoor M, Davis A, Gbedemah A, Long E. 2001. A peripheral mechanism for behavioral adaptation to specific "bitter" taste stimuli in an insect. *The Journal of Neuroscience* 21: 3688-96
- Glendinning JI, Davis A, Ramaswamy S. 2002. Contribution of different taste cells and signaling pathways to the discrimination of "bitter" taste stimuli by an insect. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 7281-7
- Goldstein A, Kaizer S, Warren R. 1965. Psychotropic effects of caffeine in man. II. Alertness, psychomotor coordination, and mood. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 150: 146-51
- Gomez-Diaz C, Reina JH, Cambillau C, Benton R. 2013. Ligands for pheromone-sensing neurons are not conformationally activated odorant binding proteins. *PLoS biology* 11: e1001546
- Graham JR. 1954. Rectal use of ergotamine tartrate and caffeine alkaloid for the relief of migraine. *The New England journal of medicine* 250: 936-8
- Graham TE, Rush JW, van Soeren MH. 1994. Caffeine and exercise: metabolism and performance. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 19: 111-38
- Grant DM, Tang BK, Kalow W. 1983. Variability in caffeine metabolism. *Clinical pharmacology and therapeutics* 33: 591-602
- Green PJ, Suls J. 1996. The effects of caffeine on ambulatory blood pressure, heart rate, and mood in coffee drinkers. *Journal of behavioral medicine* 19: 111-28
- Guengerich FP. 2003. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Molecular interventions* 3: 194-204
- Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy JP, Pasricha S, et al. 2011. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental biology* 349: 35-45
- Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B, Gould AP. 2007. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445: 275-80
- Ha TS, Smith DP. 2006. A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate-induced responses in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 8727-33
- Ha TS, Smith DP. 2009. Odorant and pheromone receptors in insects. *Frontiers in cellular neuroscience* 3: 10
- Hallem EA, Dahanukar A, Carlson JR. 2006. Insect odor and taste receptors. *Annual review of entomology* 51: 113-35
- Harada E, Haba D, Aigaki T, Matsuo T. 2008. Behavioral analyses of mutants for two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila melanogaster*. *Genes & genetic systems* 83: 257-64
- Helvig C, Koener JF, Unnithan GC, Feyereisen R. 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in

Références bibliographiques

- cockroach corpora allata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4024-9
- Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, et al. 2000. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 25: 129-38
- Hetzler RK, Knowlton RG, Somani SM, Brown DD, Perkins RM, 3rd. 1990. Effect of paraxanthine on FFA mobilization after intravenous caffeine administration in humans. *Journal of applied physiology* 68: 44-7
- Heydel JM, Coelho A, Thiebaud N, Legendre A, Le Bon AM, et al. 2013. Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anatomical record* 296: 1333-45
- Hiroi M, Meunier N, Marion-Poll F, Tanimura T. 2004. Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *Journal of neurobiology* 61: 333-42
- Hollingsworth RG, Armstrong JW, Campbell E. 2002. Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature* 417: 915-6
- Huang FF, Chai CL, Zhang Z, Liu ZH, Dai FY, et al. 2008. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*. *BMC genomics* 9: 563
- Inoshita T, Tanimura T. 2006. Cellular identification of water gustatory receptor neurons and their central projection pattern in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1094-9
- Ishay JS, Paniry VA. 1979. Effects of caffeine and various xanthines on hornets and bees. *Psychopharmacology* 65: 299-309
- Ishida Y, Leal WS. 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14075-9
- Ishii Y, Iwanaga M, Nishimura Y, Takeda S, Ikushiro S, et al. 2007. Protein-protein interactions between rat hepatic cytochromes P450 (P450s) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): evidence for the functionally active UGT in P450-UGT complex. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 22: 367-76
- Ishimoto H, Takahashi K, Ueda R, Tanimura T. 2005. G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*. *The EMBO journal* 24: 3259-65
- Iyanagi T. 2007. Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *International review of cytology* 260: 35-112
- Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-Le Meillour P. 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical senses* 26: 833-44
- Jeong YT, Shim J, Oh SR, Yoon HI, Kim CH, et al. 2013. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. *Neuron* 79: 725-37
- Jiao Y, Moon SJ, Montell C. 2007. A *Drosophila* gustatory receptor required for the responses to sucrose, glucose, and maltose identified by mRNA tagging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 14110-5
- Jin X, Ha TS, Smith DP. 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 10996-1001

- Kain P, Badsha F, Hussain SM, Nair A, Hasan G, Rodrigues V. 2010. Mutants in phospholipid signaling attenuate the behavioral response of adult *Drosophila* to trehalose. *Chemical senses* 35: 663-73
- Kalinowski RR, Jaffe LA, Foltz KR, Giusti AF. 2003. A receptor linked to a Gi-family G-protein functions in initiating oocyte maturation in starfish but not frogs. *Developmental biology* 253: 139-49
- Kalow W. 1985. Variability of caffeine metabolism in humans. *Arzneimittel-Forschung* 35: 319-24
- Kamikouchi A, Inagaki HK, Effertz T, Hendrich O, Fiala A, et al. 2009. The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature* 458: 165-71
- Kim SH, Lee Y, Akitake B, Woodward OM, Guggino WB, Montell C. 2010a. *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8440-5
- Kim YS, Choi YE, Sano H. 2010b. Plant vaccination: Stimulation of defense system by caffeine production in planta. *Plant signaling & behavior* 5
- Koganezawa M, Haba D, Matsuo T, Yamamoto D. 2010. The shaping of male courtship posture by lateralized gustatory inputs to male-specific interneurons. *Current biology : CB* 20: 1-8
- Kot M, Daniel WA. 2007. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacological reports : PR* 59: 296-305
- Kot M, Daniel WA. 2008a. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological reports : PR* 60: 789-97
- Kot M, Daniel WA. 2008b. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical pharmacology* 76: 543-51
- Kot M, Daniel WA. 2008c. Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: the pathway and concentration dependence. *Biochemical pharmacology* 75: 1538-49
- Kucerova L, Broz V, Fleischmannova J, Santruckova E, Sidorov R, et al. 2012. Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for in vivo experiments. *Journal of neurochemistry* 121: 383-95
- Kucharski R, Maleszka R. 2005. Microarray and real-time PCR analyses of gene expression in the honeybee brain following caffeine treatment. *Journal of molecular neuroscience : MN* 27: 269-76
- Lacaille F, Hiroi M, Twele R, Inoshita T, Umemoto D, et al. 2007. An inhibitory sex pheromone tastes bitter for *Drosophila* males. *PloS one* 2: e661
- Laughlin JD, Ha TS, Jones DN, Smith DP. 2008. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133: 1255-65
- Lazard D, Zupko K, Poria Y, Nef P, Lazarovits J, et al. 1991. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature* 349: 790-3

Références bibliographiques

- Le Goff G, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, et al. 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect biochemistry and molecular biology* 36: 674-82
- Leclerc S, Heydel JM, Amosse V, Gradinaru D, Cattarelli M, et al. 2002. Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain research. Molecular brain research* 107: 201-13
- Lee Y, Kim SH, Montell C. 2010. Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron* 67: 555-61
- Lee Y, Moon SJ, Montell C. 2009. Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 4495-500
- Lieberman HR, Wurtman RJ, Emde GG, Roberts C, Coviella IL. 1987. The effects of low doses of caffeine on human performance and mood. *Psychopharmacology* 92: 308-12
- Liman ER, Zhang YV, Montell C. 2014. Peripheral Coding of Taste. *Neuron* 81: 984-1000
- Lin FJ, Pierce MM, Sehgal A, Wu T, Skipper DC, Chabba R. 2010. Effect of taurine and caffeine on sleep-wake activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature and science of sleep* 2: 221-31
- Ling F, Dahanukar A, Weiss LA, Kwon JY, Carlson JR. 2014. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 7148-64
- Liu L, Leonard AS, Motto DG, Feller MA, Price MP, et al. 2003. Contribution of *Drosophila* DEG/ENaC genes to salt taste. *Neuron* 39: 133-46
- Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, Pompon D. 1998. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Molecular pharmacology* 54: 8-13
- Lorist MM, Snel J, Kok A. 1994a. Influence of caffeine on information processing stages in well rested and fatigued subjects. *Psychopharmacology* 113: 411-21
- Lorist MM, Snel J, Kok A, Mulder G. 1994b. Influence of caffeine on selective attention in well-rested and fatigued subjects. *Psychophysiology* 31: 525-34
- Lu Y, Heydel JM, Li X, Bratton S, Lindblom T, Radomska-Pandya A. 2005. Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33: 937-46
- Luque T, Okano K, O'Reilly DR. 2002. Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP-glucosyltransferase. *European journal of biochemistry / FEBS* 269: 819-25
- Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Molecular pharmacology* 62: 638-46
- Maibèche-Coisne M, Jacquin-Joly E, Francois MC, Nagnan-Le Meillour P. 2002. cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family

- in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect molecular biology* 11: 273-81
- Maibeche-Coisne M, Merlin C, Francois MC, Queguiner I, Porcheron P, Jacquin-Joly E. 2004a. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chemical senses* 29: 381-90
- Maibeche-Coisne M, Nikonov AA, Ishida Y, Jacquin-Joly E, Leal WS. 2004b. Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by in vivo inhibition of a pheromone-degrading enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11459-64
- Maida R, Ziegelberger G, Kaissling KE. 1995. Esterase activity in the olfactory sensilla of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Neuroreport* 6: 822-4
- Maitra S, Dombrowski SM, Basu M, Raustol O, Waters LC, Ganguly R. 2000. Factors on the third chromosome affect the level of *cyp6a2* and *cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 248: 147-56
- Mandel HG. 2002. Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 40: 1231-4
- Marella S, Fischler W, Kong P, Asgarian S, Rueckert E, Scott K. 2006. Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron* 49: 285-95
- Masek P, Keene AC. 2013. *Drosophila* Fatty Acid Taste Signals through the PLC Pathway in Sugar-Sensing Neurons. *PLoS genetics* 9: e1003710
- Masek P, Scott K. 2010. Limited taste discrimination in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14833-8
- Massey LK, Wise KJ. 1992. Impact of gender and age on urinary water and mineral excretion responses to acute caffeine doses. *Nutrition research* 12: 605-12
- Mathavan S, Premalatha Y, Christopher MS. 1985. Effects of caffeine and theophylline on the fecundity of four lepidopteran species. *Experimental biology* 44: 133-8
- Matsagas K, Lim DB, Horwitz M, Rizza CL, Mueller LD, et al. 2009. Long-term functional side-effects of stimulants and sedatives in *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 4: e6578
- Matsuo T. 2007. [Odorant-binding proteins and evolution of host-plant preference in insects]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* 52: 1980-6
- Merlin C, Francois MC, Bozzolan F, Pelletier J, Jacquin-Joly E, Maibeche-Coisne M. 2005. A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects. *Biochemical and biophysical research communications* 332: 4-10
- Merzendorfer H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 176: 1-15
- Meunier N, Marion-Poll F, Lucas P. 2009. Water taste transduction pathway is calcium dependent in *Drosophila*. *Chemical senses* 34: 441-9
- Meunier N, Marion-Poll F, Rospars JP, Tanimura T. 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*. *Journal of neurobiology* 56: 139-52
- Misra JR, Horner MA, Lam G, Thummel CS. 2011. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes & development* 25: 1796-806

Références bibliographiques

- Mitri C, Soustelle L, Framery B, Bockaert J, Parmentier ML, Grau Y. 2009. Plant insecticide L-canavanine repels *Drosophila* via the insect orphan GPCR DmX. *PLoS biology* 7: e1000147
- Miyamoto T, Amrein H. 2013. Diverse roles for the fructose sensor Gr43a. *Fly* 8
- Miyamoto T, Slone J, Song X, Amrein H. 2012. A fructose receptor functions as a nutrient sensor in the *Drosophila* brain. *Cell* 151: 1113-25
- Montell C. 2009. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Current opinion in neurobiology* 19: 345-53
- Montell C. 2013. Gustatory receptors: not just for good taste. *Current biology : CB* 23: R929-32
- Moon SJ, Kottgen M, Jiao Y, Xu H, Montell C. 2006. A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Current biology : CB* 16: 1812-7
- Moon SJ, Lee Y, Jiao Y, Montell C. 2009. A *Drosophila* gustatory receptor essential for aversive taste and inhibiting male-to-male courtship. *Current biology : CB* 19: 1623-7
- Morra R, Kuruganti S, Lam V, Lucchesi JC, Ganguly R. 2010. Functional analysis of the cis-acting elements responsible for the induction of the Cyp6a8 and Cyp6g1 genes of *Drosophila melanogaster* by DDT, phenobarbital and caffeine. *Insect molecular biology* 19: 121-30
- Mustard JA. 2014. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71: 1375-82
- Mustard JA, Dews L, Brugato A, Dey K, Wright GA. 2012. Consumption of an acute dose of caffeine reduces acquisition but not memory in the honey bee. *Behavioural brain research* 232: 217-24
- Nagashima A, Touhara K. 2010. Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 16391-8
- Nakayama S, Sasaki K, Matsumura K, Lewis Z, Miyatake T. 2012. Dopaminergic system as the mechanism underlying personality in a beetle. *Journal of insect physiology* 58: 750-5
- Nathanson JA. 1984. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226: 184-7
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. 2003. Effects of caffeine on human health. *Food additives and contaminants* 20: 1-30
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, et al. 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6: 1-11
- Nef P, Heldman J, Lazard D, Margalit T, Jaye M, et al. 1989. Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. *The Journal of biological chemistry* 264: 6780-5
- Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain research. Brain research reviews* 17: 139-70
- Neve EP, Ingelman-Sundberg M. 2008. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Analytical and bioanalytical chemistry* 392: 1075-84

- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 284: 13291-5
- Nighorn A, Qiu Y, Davis RL. 1994. Progress in understanding the *Drosophila* dnc locus. *Comparative biochemistry and physiology. Biochemistry and molecular biology* 108: 1-9
- Nikitin AG, Navitskas S, Gordon LA. 2008. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 63: 149-50
- Nilsson LO, Gustafsson A, Mannervik B. 2000. Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9408-12
- Nishi Y, Sasaki K, Miyatake T. 2010. Biogenic amines, caffeine and tonic immobility in *Tribolium castaneum*. *Journal of insect physiology* 56: 622-8
- Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, et al. 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* 279: 35942-9
- Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, et al. 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental biology* 298: 555-70
- Oppermann UC, Maser E. 2000. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* 144: 71-81
- Pandey UB, Nichols CD. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* 63: 411-36
- Pelosi P. 1994. Odorant-binding proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 29: 199-228
- Pelosi P. 1996. Perireceptor events in olfaction. *Journal of neurobiology* 30: 3-19
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M. 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63: 1658-76
- Perisse E, Raymond-Delpech V, Neant I, Matsumoto Y, Leclerc C, et al. 2009. Early calcium increase triggers the formation of olfactory long-term memory in honeybees. *BMC biology* 7: 30
- Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, et al. 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13773-8
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30: e36
- Pletcher SD, Libert S, Skorupa D. 2005. Flies and their golden apples: the effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age-dependent gene expression. *Ageing research reviews* 4: 451-80

Références bibliographiques

- Plowchalk DR, Rowland Yeo K. 2012. Prediction of drug clearance in a smoking population: modeling the impact of variable cigarette consumption on the induction of CYP1A2. *European journal of clinical pharmacology* 68: 951-60
- Pohanka M, Dobes P. 2013. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *International journal of molecular sciences* 14: 9873-82
- Rein J, Mustard JA, Strauch M, Smith BH, Galizia CG. 2013. Octopamine modulates activity of neural networks in the honey bee antennal lobe. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 199: 947-62
- Richmond RC, Gilbert DG, Sheehan KB, Gromko MH, Butterworth FM. 1980. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science* 207: 1483-5
- Rizvi S, Mukerji D, Mathur S. 1981. Selective phyto-toxicity of 1, 3, 7-trimethylxanthine between *Phaseolus mungo* and some weeds. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*
- Robertson AP, Clark CL, Martin RJ. 2010. Levamisole and ryanodine receptors. I: A contraction study in *Ascaris suum*. *Molecular and biochemical parasitology* 171: 1-7
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR. 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 2: 14537-42
- Rogers ME, Jani MK, Vogt RG. 1999. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *The Journal of experimental biology* 202: 1625-37
- Rosso A, Mossey J, Lippa CF. 2008. Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 23: 417-22
- Rutzler M, Zwiebel LJ. 2005. Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 191: 777-90
- Rybczynski R, Reagan J, Lerner MR. 1989. A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9: 1341-53
- Rybczynski R, Vogt RG, Lerner MR. 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *The Journal of biological chemistry* 265: 19712-5
- Sanchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J. 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity* 103: 208-16
- Sato K, Tanaka K, Touhara K. 2011. Sugar-regulated cation channel formed by an insect gustatory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 11680-5
- Schmidt B. 2005. Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) trial. *Biology of the neonate* 88: 208-13

- Schultze A, Pregitzer P, Walter MF, Woods DF, Marinotti O, et al. 2013. The co-expression pattern of odorant binding proteins and olfactory receptors identify distinct trichoid sensilla on the antenna of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PloS one* 8: e69412
- Schwab WE. 1977. The ontogeny of swimming behavior in the scyphozoan, *Aurelia aurita*. I. Electrophysiological analysis. *The Biological bulletin* 152: 233-50
- Scott K, Brady R, Jr., Cravchik A, Morozov P, Rzhetsky A, et al. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104: 661-73
- Sellier MJ, Reeb P, Marion-Poll F. 2011. Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chemical senses* 36: 323-34
- Shanbhag SR, Hekmat-Scafe D, Kim MS, Park SK, Carlson JR, et al. 2001a. Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microscopy research and technique* 55: 297-306
- Shanbhag SR, Park SK, Pikielny CW, Steinbrecht RA. 2001b. Gustatory organs of *Drosophila melanogaster*: fine structure and expression of the putative odorant-binding protein PBPRP2. *Cell and tissue research* 304: 423-37
- Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. 2000. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 1834-7
- Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW. 1993. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cellular and molecular neurobiology* 13: 247-61
- Si A, Zhang SW, Maleszka R. 2005. Effects of caffeine on olfactory and visual learning in the honey bee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 82: 664-72
- Smith A. 2002. Effects of caffeine on human behavior. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 40: 1243-55
- Smyth D. 1992. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *J Plant Growth Regul* 11: 125-28
- Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 6321-4
- Steinbrecht RA. 1998. Odorant-binding proteins: expression and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855: 323-32
- Stocker RF. 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and tissue research* 275: 3-26
- Sun W, Margam VM, Sun L, Buczkowski G, Bennett GW, et al. 2006. Genome-wide analysis of phenobarbital-inducible genes in *Drosophila melanogaster*. *Insect molecular biology* 15: 455-64
- Swarup S, Morozova TV, Sridhar S, Nokes M, Anholt RR. 2014. Modulation of feeding behavior by odorant-binding proteins in *Drosophila melanogaster*. *Chemical senses* 39: 125-32

Références bibliographiques

- Taketo M, Matsuda H, Yoshioka T. 2004. Calcium-independent inhibition of GABA(A) current by caffeine in hippocampal slices. *Brain research* 1016: 229-39
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, McManus ME, Tassaneeyakul W, Veronese ME, et al. 1994. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochemical pharmacology* 47: 1767-76
- Thiebaud N, Sigoillot M, Chevalier J, Artur Y, Heydel JM, Le Bon AM. 2010. Effects of typical inducers on olfactory xenobiotic-metabolizing enzyme, transporter, and transcription factor expression in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38: 1865-75
- Thiebaud N, Veloso Da Silva S, Jakob I, Sicard G, Chevalier J, et al. 2013. Odorant metabolism catalyzed by olfactory mucosal enzymes influences peripheral olfactory responses in rats. *PloS one* 8: e59547
- Thistle R, Cameron P, Ghorayshi A, Dennison L, Scott K. 2012. Contact chemoreceptors mediate male-male repulsion and male-female attraction during *Drosophila* courtship. *Cell* 149: 1140-51
- Thorne N, Amrein H. 2008. Atypical expression of *Drosophila* gustatory receptor genes in sensory and central neurons. *The Journal of comparative neurology* 506: 548-68
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189-98
- Toda H, Zhao X, Dickson BJ. 2012. The *Drosophila* female aphrodisiac pheromone activates ppk23(+) sensory neurons to elicit male courtship behavior. *Cell Rep* 1: 599-607
- Toshima N, Tanimura T. 2012. Taste preference for amino acids is dependent on internal nutritional state in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology* 215: 2827-32
- Uefuji H, Ogita S, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. 2003. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant physiology* 132: 372-80
- Uefuji H, Tatsumi Y, Morimoto M, Kaothien-Nakayama P, Ogita S, Sano H. 2005. Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant molecular biology* 59: 221-7
- Ueno K, Kidokoro Y. 2008. Adenylyl cyclase encoded by AC78C participates in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *The European journal of neuroscience* 28: 1956-66
- Ueno K, Kohatsu S, Clay C, Forte M, Isono K, Kidokoro Y. 2006. Gsalpha is involved in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 6143-52
- Ueno K, Ohta M, Morita H, Mikuni Y, Nakajima S, et al. 2001. Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene Gr5a. *Current biology : CB* 11: 1451-5
- Van De Bor V, Giangrande A. 2001. Notch signaling represses the glial fate in fly PNS. *Development* 128: 1381-90

- Vermehren-Schmaedick A, Scudder C, Timmermans W, Morton DB. 2011. *Drosophila* gustatory preference behaviors require the atypical soluble guanylyl cyclases. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 197: 717-27
- Victor BS, Lubetsky M, Greden JF. 1981. Somatic manifestations of caffeinism. *The Journal of clinical psychiatry* 42: 185-8
- Vogt RG. 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*: 391-445
- Vogt RG, Riddiford LM. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161-3
- Vosshall LB, Stocker RF. 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience* 30: 505-33
- Waller GR. 1989. Biochemical frontiers of allelopathy. *Biol Plant* 31: 418-47
- Wang L, Dankert H, Perona P, Anderson DJ. 2008. A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5657-63
- Wang Q, Hasan G, Pikielny CW. 1999. Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae. *The Journal of biological chemistry* 274: 10309-15
- Wang X, Liu L, Xia S, Feng C, Guo A. 1998. Relationship between visual learning/memory ability and brain cAMP level in *Drosophila*. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* 41: 503-11
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Jarcho M, Parvy JP, et al. 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11043-8
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Parvy JP, Shinoda T, et al. 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect biochemistry and molecular biology* 34: 991-1010
- Weiss LA, Dahanukar A, Kwon JY, Banerjee D, Carlson JR. 2011. The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* 69: 258-72
- Welsh EJ, Bara A, Barley E, Cates CJ. 2010. Caffeine for asthma. *The Cochrane database of systematic reviews*: CD001112
- Willingham AT, Keil T. 2004. A tissue specific cytochrome P450 required for the structure and function of *Drosophila* sensory organs. *Mechanisms of development* 121: 1289-97
- Willoughby L, Chung H, Lumb C, Robin C, Batterham P, Daborn PJ. 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect biochemistry and molecular biology* 36: 934-42
- Wisotsky Z, Medina A, Freeman E, Dahanukar A. 2011. Evolutionary differences in food preference rely on Gr64e, a receptor for glycerol. *Nature neuroscience* 14: 1534-41

Références bibliographiques

- Wojtasek H, Leal WS. 1999. Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS letters* 458: 333-6
- Wright GA, Baker DD, Palmer MJ, Stabler D, Mustard JA, et al. 2013. Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward. *Science* 339: 1202-4
- Wu MN, Ho K, Crocker A, Yue Z, Koh K, Sehgal A. 2009. The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require PKA activity, but not the adenosine receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 11029-37
- Xu C, Li CY, Kong AN. 2005a. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* 28: 249-68
- Xu P. 2005. Eppendorf 2005 winner. A *Drosophila* OBP required for pheromone signaling. *Science* 310: 798-9
- Xu P, Atkinson R, Jones DN, Smith DP. 2005b. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron* 45: 193-200
- Yang J, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, et al. 2007. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological genomics* 30: 223-31
- Zhang YV, Ni J, Montell C. 2013a. The molecular basis for attractive salt-taste coding in *Drosophila*. *Science* 340: 1334-8
- Zhang YV, Raghuwanshi RP, Shen WL, Montell C. 2013b. Food experience-induced taste desensitization modulated by the *Drosophila* TRPL channel. *Nature neuroscience* 16: 1468-76
- Zhou JJ. 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitamins and hormones* 83: 241-72

Rôle des Cytochromes P450 dans la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*

Les insectes ont développé un système chimiosensoriel gustatif leur permettant de discriminer les stimuli sensoriels indispensables à leur survie et à leur reproduction. Afin d'être efficace, le système gustatif doit être sensible et permettre une élimination rapide des molécules sensorielles afin d'éviter la saturation des récepteurs et ainsi assurer la détection et l'intégration des signaux chimiosensoriels.

Présentes dans l'espace péri-récepteur, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), impliquées principalement dans la détoxification des organismes, pourraient avoir un rôle central dans la modification et/ou l'arrêt du signal sensoriel en catalysant la biotransformation de ces molécules et en favorisant leur élimination.

Afin d'analyser l'implication des EMX dans les processus chimiosensoriels, nous avons centré notre étude sur le rôle potentiel des Cytochromes P450 (CYP), dans la perception et le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*.

Nous avons identifié plusieurs CYP dont l'expression est fortement modulée dans les organes sensoriels et dans le corps par la caféine. L'inhibition ciblée de l'expression de certains CYP dans les neurones sensoriels provoque une perturbation de la perception de la caféine, mettant ainsi en évidence le rôle crucial de ces enzymes dans les mécanismes chimiosensoriels. En parallèle, nous avons caractérisé le métabolisme de la caféine chez la drosophile puis, nous avons mis en évidence l'implication directe de *CYP6d5* dans la dégradation de la caféine en théobromine.

L'ensemble de ces travaux montre pour la première fois, l'implication directe des cytochromes P450 dans les mécanismes de perception sensorielle et dans le métabolisme de la caféine chez la drosophile.

Mots-clés: Caféine, Cytochromes P450, Perception gustative, Métabolisme, Drosophile

Implication of Cytochromes P450 in the sensory perception and the metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*

Insects have developed a gustatory system, allowing them to detect sensory molecules essential to their survival and their reproduction. In order to be efficient, the gustatory system must be sensitive, allowing a rapid elimination of sensory molecules in order to avoid the receptor saturation and insuring the detection and the integration of chemosensory signals.

Located in the peri-receptor environment, xenobiotic metabolizing enzymes (EMX), mainly implicated in detoxification, could have a crucial role in the modulation of the sensory signal by catalyzing the biotransformation of sensory molecules and promoting their elimination.

To analyze the involvement of XME in chemosensory processes, we focused our project on the putative role of Cytochromes P450 (CYP) in caffeine sensory perception and metabolism in *Drosophila melanogaster*.

We identified several CYP, which the expression is strongly modulated in sensory organs and in the body by caffeine. The specific-targeted silencing of some CYP expression in sensory neurons leads to an alteration of caffeine perception, revealing the crucial role of these enzymes in chemoperceptive processes. In parallel, we characterized the caffeine metabolism in *Drosophila*, and highlighted a direct involvement of *CYP6d5* in the degradation of caffeine into theobromine.

This work shows for the first time, a direct implication of cytochromes P450 in sensory perception mechanisms and in the metabolism of caffeine in *Drosophila*.

Keywords: Caffeine, Cytochrome P450, Taste perception, Metabolism, *Drosophila*